



①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Patentschrift  
⑩ DE 26 07 706 C 3

⑤① Int. Cl.<sup>5</sup>:  
C 07 K 15/22  
A 61 K 37/14

②① Aktenzeichen: P 26 07 706.5-41  
②② Anmeldetag: 25. 2. 76  
④③ Offenlegungstag: 9. 9. 76  
④⑤ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 26. 5. 88  
④⑤ Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents: 13. 5. 93

DE 26 07 706 C 3

Patentschrift nach Einspruchsverfahren geändert

③① Unionspriorität: ③② ③③ ③①  
27.02.75 US 554051

⑦③ Patentinhaber:  
Icas Corp., San Francisco, Calif., US

⑦④ Vertreter:  
Wuesthoff, F., Dr.-Ing.; Frhr. von Pechmann, E.,  
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Behrens, D., Dr.-Ing.; Goetz,  
R., Dipl.-Ing. Dipl.-Wirtsch.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000  
München

⑦② Erfinder:  
Bonsen, Pieter, Los Altos, Calif., US; Laver, Myron  
B., Weston, Mass., US; Morris, Kent C., Mountain  
View, Calif., US

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE-PS 24 49 885  
DE-PS 22 48 475  
DE-AS 19 15 970  
DE-OS 24 17 619  
NL 74 04 140

WOLD, F. in Methods in Enzymology, Bd. XI, 1967,  
S.617-640;  
Annals of Surgery, S. 615-622, 1970;  
J. exp. Med. 126, S. 1127-1142, 1967;  
Transfusion 17, S. 555-562, 1977;  
Prog. Clin. Biol. Res. 19, S. 149-165, 1978;

⑤④ Wasserlösliches, polymerisiertes vernetztes Hämoglobin, Verfahren zu seiner Herstellung und seine  
Verwendung

DE 26 07 706 C 3

## Beschreibung

Hämoglobin ist im Blut von Säugetieren vorhanden, und es besitzt die grundlegende Eigenschaft, daß es in Lösung reversibel oxidiert werden kann. In der natürlichen Form ist Hämoglobin von Säugetieren ein konjugiertes nicht vernetztes Protein, das ein Molekulargewicht von 64 500 hat und strukturell aus zwei Untereinheiten besteht. Jede Untereinheit enthält eine Hämgruppe und eine Polypeptidkette, genannt Globin. Bei Säugetieren ist Hämoglobin in Erythrocyten zusammen mit Stroma vorhanden, das aus Proteinen, Phospholipiden und Cholesterin besteht.

Die Umsetzung von isolierten Rinder-Hämoglobin, enthaltend Stroma, mit überschüssigem Glutaraldehyd unter Bildung eines unlöslichen Niederschlages, ist in Histochemical, J., Bd. 2, Seiten 137 bis 150, 1970, beschrieben. Ähnlich ist die Umsetzung von Proteinen aus ganzem Blut mit Glutaraldehyd unter Bildung eines wasserlöslichen Leims in der US-PS 32 94 564 angegeben. Die Wechselwirkung von Kollagen und Gelatine mit Diisocyanaten und anderen mehrfach kuppelnden Mitteln, einschließlich Aldehyden ist in den US-PS 25 91 133 und 30 57 782 sowie in Biochemica et Biophysica Acta, Band 168, Seiten 341 bis 352, 1968, angegeben. Die Carboxyalkylierung von Globin zur Verwendung als Plasma-Streckmittel ist in der US-PS 27 19 837 beschrieben. Die dort beschriebenen Produkte besitzen jedoch nicht die Fähigkeit, Sauerstoff zu transportieren und infolgedessen gelangten sie nicht zur allgemeinen Anwendung. Die US-PS 25 27 210 beschreibt die Verwendung von Hämoglobin zur Behandlung von Wunden. Die US-PS 30 00 836 und 35 19 572 beschreiben Blutzubereitungen, die als Standard zur Messung von Hämoglobin geeignet sind. In der NL-PS 74 04 140 ist ein wasserlösliches, vernetztes Hämoglobin beschrieben, das Stroma enthält und als Plasmaersatz angewandt werden soll. Auch das in der DE-OS 24 17 619 angegebene polymerisierte Hämoglobin ist lediglich von größeren Membranmaterialien befreit, enthält jedoch kleinere Lipide, Lipidaggregate und Proteine, die durch das übliche Zentrifugieren nicht entfernt werden können. Alle in Hämoglobin-Zubereitungen enthaltenen Stroma-Verunreinigungen führen jedoch zu einer in-vivo Toxizität.

Die nicht vorveröffentlichte DE-PS 24 49 885 betrifft ein Verfahren zur Herstellung von chemisch modifizierten haltbaren Hämoglobinpräparaten sowie das nach diesem Verfahren hergestellte modifizierte Hämoglobin. In den Ansprüchen dieser Patentschrift ist nichts darüber ausgesagt, ob und wie weit dieses Verfahren zu einem wirklich stromafreien Produkt führt. Nach dieser Patentschrift wird ein Verfahren zur Herstellung eines chemisch modifizierten haltbaren Hämoglobinpräparates bestehend aus einer Mischung von aneinander mit Aldehyden gekoppelten Hämoglobinmolekülen beansprucht. Dem gegenüber beansprucht die vorliegende Erfindung ein anderes Verfahren. Darüber hinaus wird nach dieser Patentschrift bei der Vernetzungsreaktion kein Desaktivator für das Vernetzungsmittel eingesetzt, so daß es nicht möglich ist, die Vernetzungsreaktion und damit die Eigenschaften des erhaltenen Produktes zu steuern, so daß dieses Produkt nur begrenzt als Blutersatzstoff geeignet ist.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung eines Hämoglobins zur Verfügung zu stellen, das einfach durchgeführt werden kann und zu einem Produkt führt, das die oben erwähnten Nachteile nicht besitzt und als Blutersatzstoff verwendet werden kann.

Diese Aufgabe wird gelöst durch das in den Ansprüchen 1 bis 4 angegebene Verfahren.

Außerdem betrifft die Erfindung die Verwendung des so erhaltenen wasserlöslichen polymerisierten vernetzten Polyhämoglobins zusammen mit einem physiologisch geeigneten Träger als Blutersatzstoff oder Blutplasma-streckmittel.

Die Ausdrücke "polymerisiertes Hämoglobin", "vernetztes Hämoglobin" und "makromolekulares Hämoglobin", die im Rahmen der Beschreibung als äquivalent angesehen werden, werden im folgenden ersetzt durch den Ausdruck "Polyhämoglobin". Darunter ist zumindest ein Hämoglobin-Tetramer,  $Hb_4$ , zu verstehen, vernetzt in dem Tetramer oder mit mindestens einem anderen hämhaltigen Hämoglobin-Monomer,  $Hb$ , unter Bildung der makromolekularen Verbindung der allgemeinen Formel  $Poly(Hb)_n$ , wobei  $Hb$  das Hämoglobin-Monomer und  $n$  4 bis 60, üblicherweise 8 bis 30 bedeutet.

Das erfindungsgemäß hergestellte Polyhämoglobin (auch im folgenden immer nur kurz Polyhämoglobin) ist löslich in wäßrigen Flüssigkeiten mit einem pH-Wert von 6 bis 9 und in physiologischen Flüssigkeiten. Das Polyhämoglobin besitzt vorzugsweise ein Molekulargewicht von 64 000 bis 1 000 000 und die Eigenschaft, in Lösung reversibel gasförmige Liganden in einer Menge bis zu 60  $\mu\text{Mol}$  Ligand/g Polyhämoglobin zu binden, d. h. die Fähigkeit Liganden zu binden, liegt nahe bei 100%. Das Polyhämoglobin zeigt, je nach seiner Herstellung, einen Liganden-Teildruck bei halber Sättigung von 2,5 bis 120 mm Hg bei 37°C, gemessen bei neutralem pH und Atmosphärendruck. Die Polyhämoglobinslösungen besitzen eine Intrinsic-Viskosität von 0,04 bis 0,16 dl/g und zeigen Spektren im ultra-violetten und sichtbaren Licht, ähnlich wie nicht vernetztes Hämoglobin. Das Polyhämoglobin im oxidierten Zustand, wenn das Eisen des Häms dreiwertig ist und das Polyhämoglobin vernetztes stromafreies Polymethämoglobin ist, besitzt einen molekularen Extinktionskoeffizienten,  $\epsilon$ , bei 630 nm =  $3,5 \pm 0,4 \times 10^3$  in Abwesenheit eines Hämliganden und  $\epsilon$  bei 540 nm =  $9,5 \pm 0,5 \times 10^3$  für vernetztes stromafreies Polycyanomethämoglobin (Polymethämoglobin mit Cyanid als Hämliganden).

Das Polyhämoglobin wird hergestellt, indem man von Erythrozyten ausgeht, die von frisch entnommenem menschlichen Blut, überaltertem ganzen Blut oder Placentas gewonnen worden sind, gepackten Erythrocyten, die von Blutspendezentren erhalten worden sind, oder Erythrocyten von tierischem Blut. Das Blut wird in Flaschen gezogen, die ein Antikoagulum enthalten, zentrifugiert und das überstehende Plasma abgezogen. Das Zentrifugieren wird bei -5 bis 40°C, vorzugsweise 4 bis 6°C ungefähr 5 bis 60 Minuten 650 bis 6500 g durchgeführt, wobei das Plasma und der Leukocytenfilm im zentrifugierten Blut abgetrennt und verworfen werden. Anschließend werden die roten Zellen in ungefähr 1 bis 4 Volumina kalter isotonischer oder hypertoni-scher Salzlösung gewaschen, die Suspension zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit erneut entfernt und verworfen. Die roten Zellen werden weitere 2- bis 3mal gewaschen, wobei die Waschflüssigkeiten nach jedem

Zentrifugieren verworfen werden.

Das Verfahren zur Herstellung des Ausgangsmaterials für die Polymerisation umfaßt ein Isolieren des Hämoglobins aus den Zellen, das im wesentlichen frei ist von Zelltrümmern und Stroma. Die Entfernung von Stromaproteinen und Lipiden ist erfindungsgemäß kritisch und schließt im wesentlichen eine Nierenschädigung aus. Das Verfahren zur Herstellung von stromafreiem Hämoglobin umfaßt zunächst ein Lysieren (Lösen) der Zellen in ungefähr 1 bis 4 Volumina kaltem Wasser oder anderen lysierenden Lösungen, wie hypotonischen Phosphatpufferlösungen und hypotonischer Salzlösung. Nach der Lyse wird die Suspension von roten Zellen geschüttelt und kaltes Toluol in einer Menge von ungefähr 10 bis 200% des Zellvolumens, üblicherweise etwa 10 bis 30 Volumen-% zugegeben. Das Gemisch wird dann 4 bis 10 Minuten geschüttelt und 24 bis 72 Stunden bei 4 bis 6°C stehengelassen, wobei ein dreiphasiges Gemisch entsteht. Die untere klare rote Schicht wird isoliert und mit 40 000 bis 50 000 g mindestens 60 Minuten bei ungefähr 4 bis 6°C zentrifugiert, dann wird die obere klare Flüssigkeit abgetrennt und durch ein Diatomenerdefilter filtriert. Bei dieser Filtration werden Spuren von Stroma entfernt, und verschiedene bekannte Präzipitationstests können angewandt werden, um festzustellen, ob das Hämoglobin stromafrei ist.

Restliche niedermolekulare Salze und Metaboliten werden von dem stromafreien Hämoglobin durch Dialyse gegen Standard- oder medizinisch geeignete Puffer entfernt. Puffer, die für diesen Zweck geeignet sind, umfassen 0,05 m Phosphatlösung und physiologische Salzlösung, gepuffert mit Alkalibicarbonaten. Das stromafreie Hämoglobin kann dialysiert werden unter Verwendung von handelsüblichen Vorrichtungen wie einem Dow-miniplant unter Verwendung von Biofiber®-50, Dialysefasern, dem Kolffsystem unter Verwendung einer semipermeablen Membran oder einer Crom-A-Coil®-Einheit oder semipermeablen Dialysemembranen wie Zellulose, Zelluloseacetat und modifizierten Zelluloseacetatmembranen wie N,N-Diäthylamino-äthylzellulose-acetat und Zellulose-propionat.

Die Dialyse wird bei 4 bis 6°C durchgeführt, indem man die stromafreie Hämoglobinlösung durch Zellulose-Hohlfasern leitet, wobei das Hämoglobin gegen einen Puffer dialysiert wird, der außen an den Fasern entlanggeleitet wird. Im allgemeinen besitzen die Fasern eine Trenngrenze (exclusion limit), die den Durchgang von niedermolekularen gelösten Stoffen erlaubt, ohne daß Hämoglobin mitaustritt. Die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit ist größer als 1 ml/min, vorzugsweise 3 bis 25 ml/min. Das stromafreie Hämoglobin wird dreimal durch die Fasern geleitet, um Gleichgewicht einzustellen.

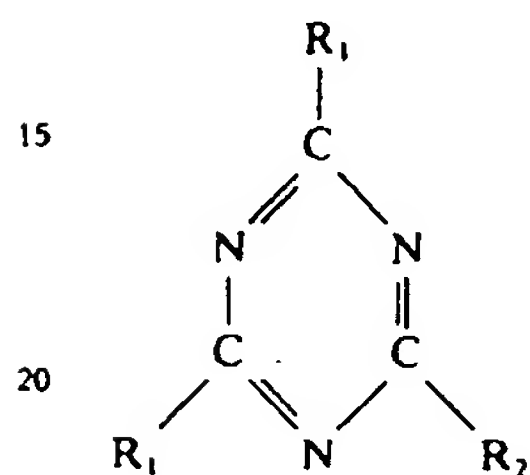
Anschließend wird das dialysierte Hämoglobin polymerisiert unter Bildung von wasserlöslichem makromolekularem vernetztem stromafreiem Polyhämoglobin. Das stromafreie Hämoglobin zur Vernetzung kann entweder einen Liganden enthalten oder nicht, je nachdem, ob Hämliganden vorhanden sind oder nicht. Wenn Sauerstoff oder Kohlenmonoxid als Hämliganden vorhanden sind, ist das Hämoglobin bekannt als Oxyhämoglobin bzw. Carbomonoxyhämoglobin. Wenn kein Hämligand vorhanden ist, nennt man das Hämoglobin Deoxyhämoglobin. Das Oxyhämoglobin und Carbomonoxyhämoglobin werden hergestellt durch Äquilibrierung mit den entsprechenden Gasen, Sauerstoff und Kohlenmonoxid, bei einer Temperatur von 4 bis 6°C ungefähr 30 bis 60 Minuten lang. Deoxyhämoglobin wird hergestellt durch wiederholte Behandlung der Lösung unter verringertem Druck, üblicherweise ungefähr 250 mm Hg und anschließendes Spülen mit Stickstoff oder einem inerten Gas wie Argon oder Neon. Deoxyhämoglobin kann auch hergestellt werden durch chemische Deoxygenierung unter Zugabe von Reduktionsmitteln wie Natriumdithionit oder Natriumsulfit. Die bevorzugten Formen von Hämoglobin zur Herstellung des erfindungsgemäß hergestellten Polyhämoglobins sind Oxyhämoglobin und Deoxyhämoglobin. Das Vernetzen dieser Hämoglobine ergibt Polyhämoglobine mit einem  $P_{50}$ -Wert von ungefähr 4 bis 120 mm Hg bei ungefähr physiologischen Bedingungen (37°C, pH 7,1) je nach der Art der Herstellung des Polyhämoglobins. Dieser Bereich von  $P_{50}$ -Werten von 4 bis 120 mm Hg umfaßt die Hämoglobin-Sauerstoff-Affinitäten wie sie sich in Blut und freiem natürlich vorkommendem Hämoglobin finden.

Die Polymerisation von dialysiertem stromafreiem Hämoglobin wird durchgeführt durch intermolekulare Vernetzung, üblicherweise der primären Aminogruppe des Lysinrestes unter Bildung von wasserlöslichem Polyhämoglobin. Die Vernetzung wird durchgeführt in Gegenwart mindestens eines polyfunktionellen Vernetzungsmittels unter Bildung von mehr als 90% makromolekularem Hämoglobin. Die Polymerisation wird durchgeführt, indem man zunächst das Reaktionsgefäß mit dem entsprechenden Gas spült. Dann wird das Hämoglobin unter einer Schutzatmosphäre des entsprechenden Gases vernetzt. Die Reaktion wird 0,25 bis 300 Stunden bei 0 bis 25°C unter Atmosphärendruck durchgeführt. Höhere Drücke bis zu 500 kPa können ebenfalls angewandt werden. Vorzugsweise wird die Temperatur zwischen 0 und 10°C gehalten, um eine thermische Oxidation von Hämoglobin zu vermeiden. Temperaturen im Bereich von 4 bis 6°C sind besonders bevorzugt. Im allgemeinen wird ungefähr ein Äquivalent Hämoglobin mit einem Molekulargewicht von 64 000 mit 2,5 bis 300 Äquivalent des polyfunktionellen Vernetzungsmittels umgesetzt.

Die Reaktion wird abgebrochen durch Zugabe eines Vernetzungsmittel-Desaktivators wie eines niedermolekularen Amins (wie die Konzentration an Vernetzungsmittel zunimmt, kann die Neigung zur Bildung unlöslicher Polymerisationsprodukte zunehmen, und das kann verhindert werden durch Zugabe eines Teils des Desaktivators vor der Zugabe des Vernetzungsmittels). Die zugesetzte Menge an Desaktivator wird so gewählt, daß sie ausreicht, um mit den nicht umgesetzten funktionellen Gruppen eines Vernetzungsmittels, das an eine Hämoglobingruppe gebunden ist, zu reagieren. Üblicherweise verwendet man eine stöchiometrische Menge oder ein Überschuß bis zu 250 Äquivalent Desaktivator auf ein Äquivalent Vernetzungsmittel. Nach der Zugabe des Desaktivators wird das Reaktionsgemisch weitere 18 bis 24 Stunden bei verminderter Temperatur gerührt. Das rohe Reaktionsgemisch wird durch Zentrifugieren geklärt und gegen eine isotonische Elektrolytlösung dialysiert. Das erhaltene lösliche Polyhämoglobin wird sterilisiert durch Filtrieren durch einen Filter mit einer Porengröße von ungefähr 0,2 bis ungefähr 0,45 µm, vorzugsweise 0,22 µm.

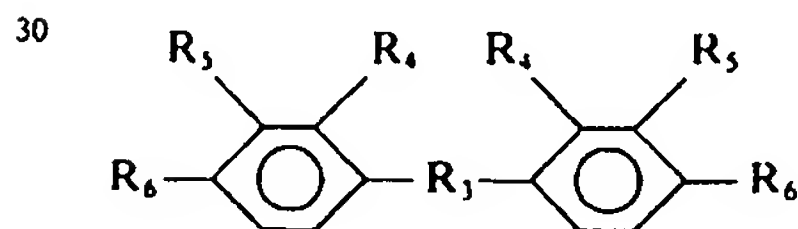
Die für die erfindungsgemäßen Zwecke geeigneten polyfunktionellen Vernetzungsmittel sind vorzugsweise wasserlöslich und reagieren mit vernetzbaren Stellen von Hämoglobin unter Bildung eines vernetzten wasser-

löslichen Produktes. Die angewandten Vernetzungsmittel üben keinen nachteiligen Effekt auf das Hämoglobin, dessen Löslichkeit oder seine Fähigkeit, reversibel Sauerstoff zu binden und zu den Geweben und Organen zu transportieren, aus. Die polyfunktionellen Vernetzungsmittel besitzen zumindest zwei funktionelle Gruppen, die gleich oder verschieden sein können. Diese Gruppen sind imstande, mit Aminogruppen und anderen vernetzbaren Stellen des Hämoglobinmoleküls zu reagieren und sie zu vernetzen. Unter Aminogruppen sind die N-terminale  $\alpha$ -Aminogruppen der Hämoglobinketten und der basischen Aminosäurereste wie Lysin und Arginin zu verstehen. Die funktionellen Gruppen des Vernetzungsmittels können kovalent miteinander verbunden sein, oder sie können durch eine aliphatische Gruppe oder einen aromatischen Ring voneinander getrennt sein. Beispiele für aromatische stabilisierte funktionelle Gruppen sind mit einer Nitrogruppe aktivierte Azo- und Halogengruppen. Diese umfassen Verbindungen mit einem heterocyclischen Ring mit reaktionsfähigen Gruppen an dem Ring wie Triazine der Formel



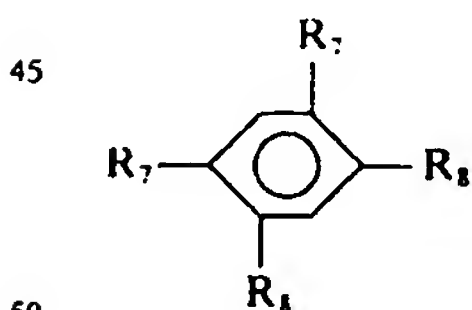
wobei  $R_1$  ein Halogenatom mit der Ordnungszahl 9 bis 35 und  $R_2$  ein nukleophiler Substituent wie eine aliphatische Gruppe (z. B. Alkylgruppe mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen) oder aromatische Gruppe, ein Halogenatom mit der Ordnungszahl 9 bis 35 oder eine Aminogruppe ist. Vernetzungsmittel dieser Formel sind z. B. 2-Amino-4,6-dichlor-s-triazin und Chlor-s-triazin.

Geeignete Vernetzungsmittel umfassen auch aromatisch stabilisierte Verbindungen der Formel



in der  $R_3$  eine kovalente Bindung, eine Alkylengruppe mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen, eine Phenyl-, Oxy-, Sulfonyl- oder sek-Aminogruppe,  $R_4$  ein Halogenatom oder eine Nitrogruppe,  $R_5$  ein Wasserstoffatom, eine Nitrogruppe, eine Alkylgruppe mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, eine Sulfo- oder Carbacylgruppe und  $R_6$  ein Halogenatom, eine Diazo-, Isocyanat- oder Isothiocyanatgruppe bedeuten. Beispielhafte Verbindungen dieser Formel sind Bis-diazobenzidin-2,2'-sulfonsäure, 4,4'-Difluor-3,3'-dinitrophenylsulfon und Diphenyl-4,4'-diisothiocyanat.

Andere geeignete Vernetzungsmittel umfassen Verbindungen der Formel

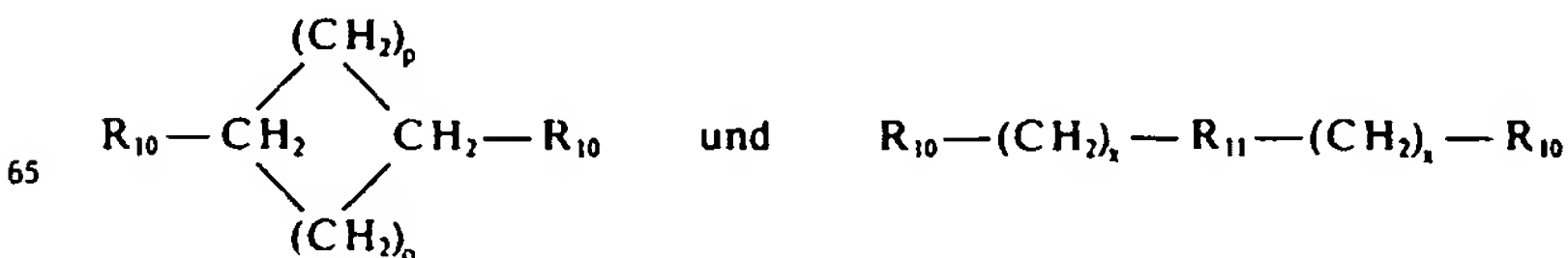
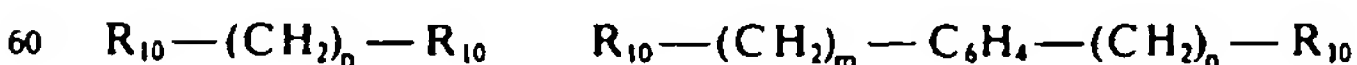


wobei  $R_7$  ein Halogenatom mit der Ordnungszahl 9 bis 35,  $R_8$  eine Nitrogruppe oder ein Wasserstoffatom bedeuten, wobei mindestens ein Rest  $R_8$  eine Nitrogruppe ist.

Eine typische Verbindung hierfür ist 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol.

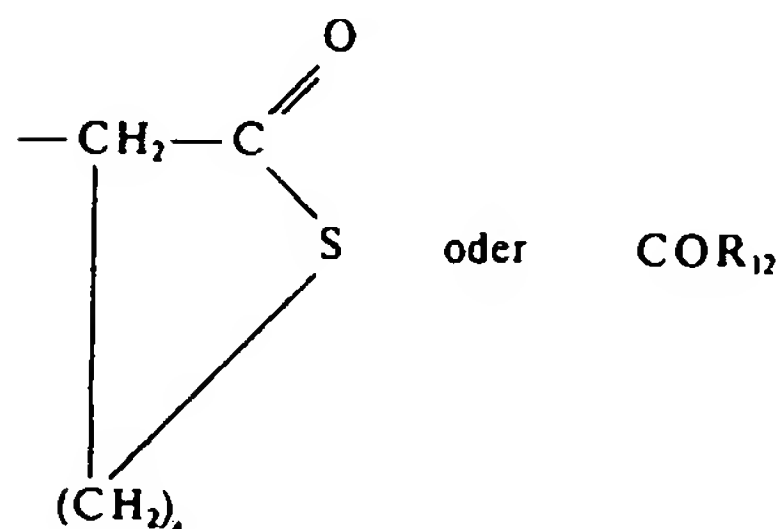
Weitere geeignete Vernetzungsmittel sind Verbindungen der Formel  $(R_9)_2C = O$ , wobei  $R_9$  ein Wasserstoff- oder Halogenatom mit der Ordnungszahl 9 bis 35 ist.

Weitere geeignete Vernetzungsmittel sind Verbindungen der Formeln





wobei n eine ganze Zahl von 1 bis 8, m eine ganze Zahl von 0 bis 3, p eine ganze Zahl von 0 bis 4, q eine ganze Zahl von 1 bis 5,  $R_{10}$  eine funktionelle Gruppe wie oben angegeben wie eine Isocyanat-, Vinyl-, Imino-, Isothiocyanat-, Isocyanid-, Aldehyd-, Epoxid-, Chlorformiat-, Trichlorformiat- oder Imidoalkylestergruppe oder eine Gruppe der Formel



wobei a eine ganze Zahl von 1 bis 3 und  $R_{12}$  ein Halogenatom oder eine Azogruppe ist und  $R_{11}$  eine Oxy-, Sulfonyl- oder zweiwertige Aminogruppe bedeutet.

Beispiele für handelsübliche Vernetzungsmittel der oben angegebenen Formeln sind Divinyl-sulfon, Epichlorhydrin, Butadien-diepoxyd, Äthylen-glykol-diglycidyläther, Glycerin-diglycidyl-äther, Dimethyl-suberimidat-dihydrochlorid, Dimethyl-malonimidat-dihydrochlorid und Dimethyl-adipimidat-dihydrochlorid.

Typische Vernetzungsmittel mit einer Isocyanat- oder Isothiocyanatgruppe sind Diphenyl-4,4'-diisothiocyanat-2,2'-disulfonsäure, Toluol-diisocyanat, Toluol-2-isocyanat-4-isothiocyanat, 3-Methoxy-diphenylmethan-4,4'-diisocyanat, Propylen-diisocyanat, Butylen-diisocyanat und Hexamethylen-diisocyanat.

Beispiele für Vernetzungsmittel mit einer Aldehyd- oder Dialdehydgruppe sind Formaldehyd, Paraformaldehyd, mit Formaldehyd aktivierte Harnstoffe wie 1,3-Bis(hydroxymethyl)-harnstoff und N,N'-Di(hydroxymethyl)-imidazolidinon-gloxal, Malondialdehyd, Bernstein-dialdehyd, Glutaraldehyd, Adipinaldehyd, 3-Methyl-glutaraldehyd, Propyladipinaldehyd, Phthaldialdehyd, Terephthaldehyd und Malondialdehyd.

Andere Vernetzungsmittel umfassen Derivate von Carbonsäuren und Carbonsäureresten von in situ aktiviertem Hämoglobin unter Bildung eines reaktionsfähigen Derivats von Hämoglobin, das mit den Aminen eines anderen Hämoglobinmoleküls vernetzt. Typische Carbonsäuren, die für diesen Zweck geeignet sind, besitzen die Formel



in denen n 1 bis 8 ist. Derartige Carbonsäuren umfassen Citronen-, Malon-, Adipin- und Bernsteinsäure. Carbonsäureaktivatoren umfassen Thionylchlorid, Carbodiimide, N-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-3'-sulfonat (Woodward's Reagens K), N,N'-Carbonyldiimidazol, N-tert.-Butyl-5-methylisoxazoliumperchlorat (Woodward's Reagens L), 1-Äthyl-3-dimethyl-aminopropylcarbodiimid, 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinäthyl)-carbodiimid-metho-p-toluol-sulfonat.

Das Vernetzungsmittel kann auch eine Dialdehydvorstufe sein, die leicht einen bifunktionellen Dialdehyd in dem Reaktionsmedium bildet. Geeignete Dialdehydvorstufen umfassen: Acroleindimer oder 3,4-Dihydro-1,2-pyran-2-carboxaldehyd, bei dem im wässrigen Medium Ringspaltung eintritt unter Bildung von  $\alpha$ -Hydroxy-adipinaldehyd. Andere Vorstufen, die bei Hydrolyse ein Vernetzungsmittel bilden, sind u. a. 2-Äthoxy-3,4-dihydro-1,2-pyran, das Glutaraldehyd ergibt, 2-Äthoxy-4-methyl-3,4-dihydro-1,2-pyran, das 3-Methyl-glutaraldehyd ergibt, 2,5-Diäthoxy-tetrahydrofuran, das Bernsteindialdehyd ergibt, und 1,1,3,3-Tetraäthoxypropan, das Malondialdehyd ergibt, und Formaldehyd aus Trioxan.

Der Vernetzungsmittel-Desaktivator, der zu dem Polymerisationsgemisch zugegeben wird, um die Reaktion abubrechen (oder gegebenenfalls, wenn er zu Beginn zugegeben wird, zur Regulierung der Vernetzungsreaktion), ist ein mono-, di- oder multifunktionelles Reagens, vorzugsweise ein primäres Amin der Formel  $\text{R}-\text{NH}_2$ . Das Amin sollte wasserlöslich sein, um dazu beizutragen, die Löslichkeitseigenschaften des polymerisierten Hämoglobins aufrechtzuerhalten. Typische niedermolekulare Amine, die angewandt werden können, sind Glycin, Lysin, Serin, Threonin, Alanin, Äthanolamin, 2-Amino-adipinsäure und Glutation. Andere Verbindungen, die geeignet sind, die Vernetzungsmittel zu desaktivieren, sind Abbruchmittel wie Bisulfite und Diole, die imstande sind, Aldehyde zu desaktivieren, niedermolekulare Alkohole zur Desaktivierung von aktivierten Carbonsäuren, aktivierte Halogenide und Isocyanate und Sulfhydryle zur Desaktivierung von Epoxiden und Vinylen.

Die Erfindung wird durch die folgenden, nicht einschränkenden Beispiele, näher erläutert.

#### Beispiel 1

#### Herstellung der Hämoglobinlösung

Das Ausgangsmaterial waren 5 Einheiten überaltertes menschliches Blut, enthaltend saure Citrat-Dextrose-Lösung als Antikoagulans. Das Blut wurde von einer lokalen Blutbank erhalten. Zunächst wurde das Blut aus den Gefäßen der Blutbank in autoklavierten 500-ml-Centrifugengefäße gegeben. Die Gefäße wurden mit einer Kappe verschlossen und das Blut, bestehend aus Erythrocyten, Leukocyten, Blutplättchen und Plasma mit 5000 UpM (4000 g), 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Dann wurden das Plasma, der Leukocytenfilm und die

Blutblättchen durch Absaugen durch eine sterile Pipette entfernt und verworfen. Die sedimentierten Erythrocyten, die zurückblieben, wurden viermal durch Suspendieren in ungefähr dem dreifachen ihres Volumens eiskalter steriler 0,9%iger physiologischer Salzlösung oder 1,6%iger Natriumchloridlösung gewaschen. Nach jedem Waschen wurden die Zellen wieder durch Zentrifugieren sedimentiert und die überstehende Flüssigkeit entfernt und verworfen.

Anschließend wurden die gewaschenen roten Zellen entweder mit einem gleichen Volumen von eiskaltem Wasser oder hypertonischer, 0,05 m Phosphatpufferlösung, pH 7,2, lysiert, um die intakten Zellwände aufzubrechen und das Hämoglobin freizusetzen. Die Lyse wurde durch 1 bis 2 Minuten langes heftiges Schütteln der Zell-Wasser-Suspension bei Raumtemperatur vervollständigt. Dann wurden die lysierten Zellen in einen sterilen 2-Liter-Scheidetrichter gegeben, wobei das gesamte Volumen der Lösung ungefähr 1500 ml betrug. Das lysierte Erythrocyten-Wasser-Gemisch wurde durch Extraktion mit 350 ml eiskaltem Toluol für Reagenzzwecke von Stroma befreit. Die Extraktion wurde durchgeführt durch zumindest fünf Minuten langes Schütteln in dem Scheidetrichter.

Nach dem Stehen bei 4°C über Nacht trennte sich das Extraktionsgemisch in drei Schichten: Eine obere Schicht aus Toluol, enthaltend Stroma und Lipide, eine mittlere Schicht von Zelltrümmern und eine untere Schicht aus der dunkelroten wäßrigen Hämoglobinschicht, 800 bis 1200 ml, wurde abgetrennt und mit 19 000 UpM (50 000 g), 60 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um die noch verbleibenden Zelltrümmer zu sedimentieren. Wenn nach dem Extrahieren mit Toluol keine Trennung der Schichten eintritt, wird die Toluol-Wasser-Zellemulsion entweder durch Zentrifugieren mit 5000 UpM (4000 g) 30 Minuten bei 4°C oder durch Behandeln der Emulsion mit 0,15 Volumina Celite®-535 Filterhilfe, einem Diatomeenerdefilter, aufgebrochen. Die wäßrige Hämoglobinschicht wird vor dem Celite® durch Vakuumfiltration und Zentrifugieren mit 19 000 UpM (50 000 g) entfernt. Etwaige letzte Spuren von Stroma in dem Hämoglobin wurden entweder durch Filtrieren durch Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm oder durch Durchleiten durch eine 3,8 cm (1,5 inch) dicke Schicht naßgepackter Celite®-535 Filterhilfe, die vorher sauer und anschließend mit sterilem pyrogenfreiem Wasser gewaschen worden war, entfernt.

Anschließend wurde die frisch hergestellte stromafreie Hämoglobinschicht gegen 0,05 m Phosphatpuffer, pH 7,6 mit Hilfe eines Dow Biofiber®-50 Miniplant-Dialysator dialysiert. Die semipermeablen hohlen Zellulosefasern des Dialysators wurden zunächst mit 2,5% Formalin gewaschen und dann mit sterilem pyrogenfreiem Wasser gespült, um eine mögliche Verunreinigung des Hämoglobins durch Bakterien zu vermeiden. Die Außenseite der Dialysehohlfasern wurde mit sterilem Wasser und sterilem Phosphatpuffer gespült. Dann wurde die Hämoglobinschicht mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/min durch die Fasern geleitet, während der Puffer außen um die Fasern geleitet wurde und der Fluß des Puffers gegen die Fließrichtung des Hämoglobins mit einer Geschwindigkeit von 100 ml/min stattfand. Die Hämoglobinschicht wurde wiederholt durch die Fasern geleitet, zumindest dreimal, um einen vollständigen Elektrolytaustausch und Entfernung von zellulären Kaliumionen sicherzustellen. Die Hämoglobinschicht wurde weiter geklärt und sterilisiert durch Druckfiltration durch ein 0,22 µm Filter, bestehend aus gemischten Estern von Zellulose der Millipore Corporation. Die stromafreie Hämoglobinschicht wurde durch Zutropfen von ungefähr 1 ml eiskalter gesättigter Ammoniumsulfatlösung zu 1 ml Hämoglobinschicht unter konstantem Rühren untersucht, ob sie stromafrei war. Wenn kein Niederschlag auftritt, ist die Lösung stromafrei. Die Hämoglobinschicht wurde bis zum Verbrauch bei 4 bis 6°C gelagert.

Die Hämoglobinschicht wurde analysiert, um die Menge an Methämoglobin und Gesamthämoglobin in der Zubereitung zu bestimmen. In Oxyhämoglobin ist das Eisen der Hämgruppe zweiwertig. Wenn Hämoglobin zu Methämoglobin oxidiert wird, liegt das Eisen in dreiwertigem Zustand vor. Da Methämoglobin nicht imstande ist, Liganden wie CO, O<sub>2</sub> und NO zu transportieren, ist sein Vorhandensein in wesentlichen Mengen in der Hämoglobinzubereitung unerwünscht. Das Vorhandensein von Methämoglobin wurde spektrophotometrisch nach dem modifizierten Cyanomethämoglobinverfahren bestimmt (Hawk's Physiological Chemistry, Seite 1096, 1968). Die Konzentration an Hämoglobin und Methämoglobin in der Hämoglobinschicht wurden folgendermaßen bestimmt: Zunächst wurde die Hämoglobinschicht auf eine Konzentration von ungefähr 10 mg/ml verdünnt (Lösung A) und die Absorption der Lösung bei 630 nm gegen Wasser bestimmt (L<sub>1</sub>). Ein Tropfen einer KCN-Lösung (1 Teil 10% KCN und 1 Teil 0,05 m Phosphat, pH 7,6) wurde zugegeben und die Lösung gemischt. Durch diese Zugabe wird gegebenenfalls vorhandenes Methämoglobin in Cyanomethämoglobin umgewandelt. Nach zwei Minuten wird die Absorption der Lösung bei 630 nm gegen destilliertes Wasser erneut abgelesen (L<sub>2</sub>). Cyanomethämoglobin absorbiert nicht bei 630 nm. Dann wird 1 ml der Lösung A mit 9 ml destilliertem Wasser verdünnt. Ein Tropfen 20%iges Kaliumferricyanid wird zugegeben und nach zwei Minuten ein Tropfen von 10%igem KCN. Die Lösung wird gemischt und die Absorption bei 540 nm gegen eine Blindprobe, bestehend aus 10 ml Wasser, enthaltend je einen Tropfen 20%iges Kaliumferricyanid und 10%iges KCN, abgelesen (L<sub>3</sub>). Die Konzentration von Methämoglobin und Hämoglobin wird folgendermaßen berechnet:

Konzentration von Methämoglobin (mM) =  $\frac{L_1 - L_2}{3,7} \times \text{Verdünnungsfaktor der Lösung A}$ , (εmM = 3,7 für Methämoglobin bei 630 nm).

Gesamtkonzentration von Hämoglobin (mM) =  $\frac{L_3}{11,0} \times \text{Verdünnungsfaktor der Lösung A} \times 10$  (εmM = 11,0 für Cyanomethämoglobin bei 540 nm).

Die Ergebnisse für frisch hergestelltes Hämoglobin waren 0 bis 0,3% (Gew./Vol.) Methämoglobin, während die Gesamthämoglobinkonzentration üblicherweise 13 bis 14% (Gew./Vol.) oder 130 bis 140 mg Hämoglobin/ml betrug.

Die Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin zur Bestimmung des millimolaren Extinktionskoeffizienten bei einer Wellenlänge maximaler Absorption wurde durchgeführt durch Umsetzung von Hämoglobin mit Kaliumferricyanid, wobei die zuletzt genannte Verbindung in einem 5%igen Überschuß, bezogen auf Hämäqui-

valent, vorhanden war. Ein etwaiger Überschuß an niedermolekularen Reagenzien wurde entfernt durch Dialyse gegen 0,2 m Phosphatpuffer, pH 6,8, und anschließende Dialyse gegen glasdestilliertes Wasser nach dem in Science, Band 144, Seite 68, 1968 angegebenen Verfahren.

Zur Bestimmung der millimolaren Extinktionskoeffizienten wurde der Eisengehalt der Probe bestimmt durch Atomabsorptionsspektroskopie nach dem in Am. J. Clin. Path., Band 48, Seiten 225 bis 228, 1967, angegebenen Verfahren und der in The Physiologist, Band 15, Seite 138, 1972, angegebenen Modifizierung. Entsprechend der Modifizierung wird eine 0,007%ige Lösung von Albumin zu dem Vergleichseisenstandard zugegeben, um die Proteinkonzentration in den Standards und Proben anzugleichen.

Aus der Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge maximaler Absorption,  $\lambda$ , und dem Eisengehalt der Probe werden die Extinktionskoeffizienten nach der folgenden Formel berechnet:

$$\epsilon = \frac{\text{Absorption bei } \lambda_{\text{max}}}{\text{Mol Fe}}$$

Mit Hilfe des angegebenen Verfahrens ergab das nach Beispiel 1 hergestellte Hämoglobin, wenn es zu Methämoglobin oxidiert worden war,  $\epsilon = 3,7 \times 10^3$  bei 630 nm und wenn Cyanid zugegeben worden war,  $\epsilon = 11,1 \times 10^3$  bei 540 nm. Die spektralen Eigenschaften von Hämoglobin und Polyhämoglobin sowohl in Form von Methämoglobin als auch von Cyanomethämoglobin sind in Tabelle 2 angegeben.

## Beispiel 2

### Umsetzung von Deoxyhämoglobin mit Glutaraldehyd

In einen 1-Liter-Kolben, der mit Argon bei ungefähr 4°C äquilibriert war, wurden unter Luftausschluß 250 ml Deoxyhämoglobinslösung, 14,2% (Gew./Vol.) in 0,05 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,1 und einem Methämoglobingehalt von weniger als 0,3% (Gew./Vol.) zugegeben. Die Lösung wurde durch kontinuierliches Spülen mit Stickstoff frei von Luft gehalten. Dann wurden 4,65 ml einer 1,3 m Lysinmonohydrochloridlösung in von Luft befreitem 0,05 m Phosphatpuffer zugegeben und die Lösung 18 Stunden mit Stickstoff äquilibriert, um möglicherweise noch vorhandene Spuren von Luft zu entfernen.

Anschließend wurden 5 ml 25%igen wäßrigen Glutaraldehyds auf 125 ml mit von Sauerstoff befreitem 0,05 m Phosphatpuffer verdünnt, um eine 0,1 m Glutaraldehydlösung, pH 7,6, zu erhalten. 121 ml dieser Lösung wurden zu der Deoxyhämoglobin-Lysin-Lösung zugegeben. Die entstehende Lösung wurde 3 bis 18 Stunden unter den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen gerührt, um eine Vernetzung des Deoxyhämoglobins sicherzustellen. Die Vernetzungsreaktion wurde abgebrochen durch Zugabe von 46,5 ml von Luft befreiter Lysinlösung, 1,3 m, und die Lösung wurde weitere 18 Stunden gerührt.

Nach dem Abbruch der Reaktion wurde die Reaktionslösung mit 100%igem Sauerstoff oxidiert und die Lösung geklärt durch Zentrifugieren und Filtrieren durch ein 0,65 µm Millipore®-Filter. Diese und die folgenden Stufen wurden so durchgeführt, daß die Temperatur der Lösung nicht über 15°C steigen konnte. Die geklärte Lösung wurde gegen eine geeignete Elektrolytlösung dialysiert, um nicht gebundenen Glutaraldehyd und überschüssiges Lysin zu entfernen. Das Gesamtvolumen nach der Dialyse betrug 350 ml mit einem pH-Wert von 6,77 bei 37°C in normaler physiologischer Salzlösung.

Gegebenenfalls können Kationen und andere Komponenten in dieser Verfahrensstufe zu der Polyhämoglobinslösung zugegeben werden. Auch kann der pH-Wert auf den Wert der Umgebung gebracht werden, bei der das Produkt angewandt werden soll, und die Lösung kann durch Filtrieren durch eine Autoklaven-Filtrationseinheit, fassend ein Filter mit einer Porengröße von ungefähr 0,22 µm, sterilisiert werden.

Die Spektralanalyse der Lösung im ultravioletten und sichtbaren Bereich ergab die in Fig. 1 gezeigte Absorptionskurve. Die Spektralanalyse des durch Äquilibrieren der Lösung mit Stickstoff erhaltenen deoxygenierten polymerisierten Hämoglobins ergab die in Fig. 2 angegebene Kurve. Die molaren Extinktionskoeffizienten für Polymethämoglobin und Polycyanomethämoglobin, die erhalten worden waren durch Oxidation von Polyhämoglobin mit Kaliumferricyanid entsprechend Beispiel 1, wurden bestimmt und die Ergebnisse sind in Tabelle 2 angegeben.

Die Bestimmung der intermolekularen Vernetzung zwischen Hämoglobintetrameren wurde durchgeführt durch Gelfiltration mit Hilfe eines biologisch inerten Polyacrylamids mit einer Molekulargewichtsausschlußgrenze von 150 000 Dalton. Das eluierte Material wurde bei 546 nm beobachtet. Das Elutionsprofil zeigte, daß die angewandten Reaktionsbedingungen über 90% makromolekulares Hämoglobin ergaben, da der überwiegende Teil (> 90%) des eluierten Proteins von den Gelporen zurückgehalten wurde. Das Polyacrylamidgel ist im Handel erhältlich als Bio-Gel® P-150 der Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA.

Ein weiterer Hinweis auf die Vernetzung wurde durch Dodecylsulfat-Polyacrylamid-gel-Elektrophorese erhalten. Das angewandte Verfahren ist beschrieben in J. Biol. Chem., Band 244, Seiten 4406 bis 4412, 1969. Das Ergebnis dieser Analyse zeigte, daß Deoxyhämoglobin, das mit Glutaraldehyd polymerisiert war, aus kovalent vernetzten Aggregaten bestand mit Molekulargewichten entsprechend einem ganzzahligen vielfachen des Monomers,  $1 < n < 8$ .

Das Molekulargewicht des polymerisierten Hämoglobins wurde bestimmt durch Geldurchdringungschromatographie. Verfahren für Molekulargewichtsbestimmungen sind beschrieben in Biochem. Biophys. Acta, Band 79, Seiten 393 bis 406, 1964.

Die Geldurchdringung durch Agarosegel wurde zur Molekulargewichtsbestimmung angewandt. Das Agarosegel besitzt eine Molekulargewichtsausschlußgrenze von  $20 \times 10^6$  Dalton.



Die kugelförmigen Agarosegelperlen sind erhältlich als Sepharose®4-B von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden. Beim Eluieren durch eine Säule, die mit Globularproteinen geeicht war, erhielt man das zahlenmäßige Molekulargewichtsmittel,  $\bar{M}_N$ , das Gewichtsmittel des Molekulargewichts,  $\bar{M}_w$ , und den Grad der Polymerisation, D.P., für das polymerisierte Hämoglobin. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 angegeben.

5 Eine weitere Charakterisierung des Polyhämoglobins wurde erreicht durch Messung der Viskosität und Osmolarität. Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Viskosität für mit Glutaraldehyd vernetztes Deoxyhämoglobin im Vergleich zu Hämoglobin sowie ein Newton'sches Verhalten, was die Unabhängigkeit der Viskosität von der Scherkraft zeigt. Dieses Polymer zeigte eine starke Zunahme der relativen Viskosität mit der Konzentration, wie aus Fig. 4 hervorgeht und durch die die Kreise verbindende Kurve angegeben ist. Die Viskositätsdaten wurden  
10 mit einem Ostwald-Viskosimeter Nr. 25 bei 37°C nach der ASTM-Bestimmung D2162-64 erhalten. Die Osmolarität wurde mit einem Dampfdruckosmometer, Model 302B der Hewlett Packard, bestimmt, das mit Hilfe des modernen Gefrierpunktsstandards NaCl geeicht war. Die polymerisierten Hämoglobinslösungen in einem physiologisch geeigneten Träger waren alle iso-osmotisch, 300 mOsm/kg H<sub>2</sub>O ( $\pm 10\%$ ) mit einer Intrinsic-Viskosität  $[\eta] = 0,091$  dl/g.

15 Der Grad der kationischen Bindung an Polyhämoglobin wurde bestimmt durch Zugabe von entweder Calcium- oder Magnesiumionen zu der Lösung. Die Proben wurden 15 Minuten bis 18 Stunden bei 4°C inkubiert und das makromolekulare Hämoglobin von dem Lösungsmittel abgetrennt durch Zentrifugieren durch einen Membranultrafilter mit einer Rückhaltgrenze für ein Molekulargewicht von 50 000. Diese Ultrafilter sind unter dem Namen Centriflo®-Membrane-Ultrafilters der Amicon Corporation, Lexington, Massachusetts USA im Handel.  
20 Das klare Filtrat wurde auf den Calcium- oder Magnesiumgehalt untersucht mit Hilfe von Calcium Rapid Stat® und Magnesium Rapid Stat® der Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois USA. Die Ergebnisse zeigten keine Bindung von Calcium- oder Magnesiumionen an das Polyhämoglobin.

Die Sterilität der Lösungen wurde nach Standardverfahren für flüssige Medien USP XVIII, Seiten 856 bis 865, 1970, bestimmt. Alle Proben, die durch ein 0,22- $\mu$ m-Filter filtriert worden waren, erwiesen sich als steril.

25 Die Analyse des polymerisierten Hämoglobins auf Gesamthämoglobin und Methämoglobin nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren ergab eine Hämoglobinkonzentration von ungefähr 8% (Gew./Vol.) und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,6% (Gew./Vol.), was zeigt, daß das Hämoglobineisen im zweiwertigen Zustand verblieben ist. Die Sauerstoffbindungsfähigkeit wurde in einer Van Slyke-Vorrichtung nach dem in J. Biol. Chem. Band 61, Seiten 523 bis 573, 1924, angegebenen Verfahren bestimmt und es zeigte sich,  
30 daß sie nahe bei 100% lag. Die Sauerstoffaffinität des makromolekularen Hämoglobins, gemessen als Teildruck Sauerstoff, der erforderlich ist, um die Polyhämoglobinlösung zur Hälfte zu sättigen, wurde zu 22 mm  $\text{mm Hg}$  Sauerstoffdruck oder  $P_{50} = 22$  mm Hg bei Atmosphärendruck und 37°C bei einer Lösung mit einem pH-Wert von 7,1 gefunden. Die Sauerstoff-Dissoziationskurve ist in Fig. 3 angegeben. Die Sauerstoff-Dissoziationskurven von Hämoglobin und dessen Derivaten werden bestimmt, indem man zunächst eine Hämoglobinprobe durch  
35 Tonometrie mit einem Gasgemisch bekannter Zusammensetzung äquilibriert und dann die äquilibrierte Probe spektrophotometrisch mißt. Die Sauerstoffdissoziationskurven für Hämoglobin und dessen Derivate werden auch bestimmt, indem man tonometriertes Hämoglobin verwendet und es in einer Sauerstoffsättigungsmeßvorrichtung (Oxygen Saturationmeter) photometrisch mißt. Das für diese Bestimmungen angewandte Verfahren und Tonometer sind beschrieben in Pflügers Archiv, Band 15, Seiten 418 bis 424, 1960; Operators Manual-137  
40 Tonometer, Seiten 1 bis 14 und 37 bis 42, 1965, veröffentlicht von Instrumentation Laboratory, Inc., Lexington, Massachusetts, USA; und J. Appl. Physiol., Band 28, Seiten 227 bis 233, 1970. Die Sauerstoff-Sättigungsverfahren sind bekannt (Scan. J. Clin. Lab. Inv. Band 14, Seiten 587 bis 597, 1962).

### Beispiel 3

45

#### Reaktion von Oxyhämoglobin mit Glutaraldehyd

Die Polymerisation von Oxyhämoglobin mit Glutaraldehyd wurde durchgeführt, indem man das Verfahren des Beispiels 2 mit allen dort angegebenen Bedingungen wiederholte, mit der Ausnahme, daß die Lösungen und  
50 die Reaktionsumgebung Sauerstoff enthielten (are kept aerobic) durch Äquilibrieren entweder mit Luft oder mit 100%igem O<sub>2</sub>. Gegebenenfalls kann die polymerisierte Oxyhämoglobinlösung durch Filtrieren durch einen 0,45  $\mu$ m Filter sterilisiert werden.

Die Bestimmung der intermolekularen Vernetzung wurde durch Gelfiltration, wie in Beispiel 2 angegeben, durchgeführt und das entstehende Elutionsprofil zeigte, daß die Reaktion zu 90% makromolekularem Hämoglobin geführt hatte. Die Ergebnisse der Molekulargewichtsanalyse sind in Tabelle 1 angegeben. Die makromolekulare Oxyhämoglobinlösung war iso-osmotisch, 300 mOsm/kg H<sub>2</sub>O ( $\pm 10\%$ ) mit einer Intrinsic-Viskosität ( $\eta$ ) = 0,110 dl/g. Dieses Polymer zeigte eine starke Zunahme der relativen Viskosität mit der Konzentration, wie in Fig. 4 durch die die Dreiecke verbindende Kurve angegeben ist.

Die Analyse des Polyhämoglobins auf Gesamthämoglobin und Methämoglobin zeigte eine Hämoglobinkonzentration von ungefähr 8% (Gew./Vol.) und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,6% (Gew./Vol.). Die Sauerstoffaufnahmefähigkeit wurde zu nahe 100% gefunden, der  $P_{50}$ -Wert war 4 mm Hg Sauerstoffdruck bei Atmosphärendruck und 37°C mit einer Lösung mit einem pH-Wert von 7,1 und einer Sauerstoffdissoziationskurve wie in Fig. 5 angegeben.

65

### Beispiel 4

#### Umsetzung von Deoxyhämoglobin mit Divinylsulfon



In einen 1-Liter-Kolben, der mit Argon bei ungefähr 4°C äquilibriert war, wurden unter Luftausschluß 250 ml Deoxyhämoglobinlösung 14% (Gew./Vol.) in 0,05 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,1 und einem Methämoglobingehalt von weniger als 0,3% (Gew./Vol.) gegeben. Die Lösung wurde durch kontinuierliches Spülen mit feuchtem Stickstoff frei von Luft gehalten. Die Deoxyhämoglobinlösung wurde dann 18 Stunden mit Stickstoff äquilibriert, um möglicherweise noch vorhandene Luftverunreinigungen zu entfernen.

Anschließend wurden 115 mg (0,85 ml) Divinylsulfon zugegeben und die Reaktionslösung 72 bis 96 Stunden bei 4°C gerührt. Alle 24 Stunden wurde der pH-Wert eines kleinen Anteils von ungefähr 0,5 cm<sup>3</sup> der Reaktionslösung bestimmt und das Fortschreiten der Reaktion durch Gelfiltration durch Bio-Gel® P-150, wie oben beschrieben, bestimmt. Wenn notwendig, wurde der pH-Wert mit 1n NaOH auf ungefähr 7,2 bis 7,4 eingestellt. Wenn die Gelfiltration zeigte, daß ungefähr 80 bis 90% des roten Materials außerhalb des Gels blieben, d. h.  $M_w > 150\,000$  Dalton, wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 ml von Luft befreiter 1,3 m Lysinlösung zur Desaktivierung nicht umgesetzter Vinylgruppen abgebrochen. Dann wurde die Reaktionslösung weitere 18 Stunden unter Luftausschluß gehalten und gerührt.

Nach dem Abbruch der Reaktion wurde die Reaktionslösung mit 100%igem Sauerstoff oxidiert und die Lösung durch Zentrifugieren und Filtern durch einen 0,65 µm Millipore®-Filter geklärt. Diese Stufen und alle folgenden Stufen wurden durchgeführt, ohne daß die Temperatur über 15°C steigen konnte. Die geklärte Lösung wurde dann gegen einen Elektrolyten dialysiert, um nicht gebundenes Divinylsulfon und überschüssiges Lysin zu entfernen. Das Gesamtvolumen nach der Dialyse betrug 280 ml mit einem pH-Wert von 6,92 bei 37°C in physiologischer Salzlösung. Die makromolekulare Hämoglobinlösung wurde mit einem physiologisch geeigneten Träger vermischt, der pH-Wert auf einen physiologisch geeigneten Bereich eingestellt, wie in Beispiel 2 beschrieben, und die Lösung durch Filtrieren durch einen Millipore®-Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm sterilisiert.

Die prozentuale Umwandlung von Hämoglobin zu makromolekularem Hämoglobin wurde durch Gelfiltration bestimmt, und die kovalente Vernetzung wurde nachgewiesen durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat, wie in Beispiel 2 beschrieben. Ähnliche Ergebnisse wurden für Deoxyhämoglobin, das mit Divinylsulfon vernetzt war, gefunden wie für mit Glutaraldehyd vernetztes Deoxyhämoglobin, wie in Beispiel 2 beschrieben. Die Spektralanalyse der oxidierten Lösung im ultravioletten und sichtbaren Bereich zeigte das in Fig. 6 angegebene Spektrum. Die Analyse der durch Äquilibrieren mit Stickstoff deoxygenierten makromolekularen Hämoglobinlösung zeigte das in Fig. 7 angegebene Spektrum. Die Ergebnisse der Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 2 angegeben.

Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe der Geldurchdringungschromatographie und Viskositätsmethoden sind in Tabelle 1 angegeben. Die Polyhämoglobinlösung in einem physiologischen Träger war iso-osmotisch, 300 mOsm/kg H<sub>2</sub>O ( $\pm 10\%$ ), mit einer Intrinsic-Viskosität  $[\eta] = 0,139$  dl/g. Die relative Viskosität war im wesentlichen unabhängig von der Konzentration, wie in Fig. 4 angegeben, wobei dieses Polymer durch die die Quadrate verbindende Kurve dargestellt ist. Die Analyse des makromolekularen Hämoglobins auf Gesamthämoglobin und Methämoglobin ergab eine Hämoglobinkonzentration von ungefähr 8,5% (Gew./Vol.) und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,4% (Gew./Vol.). Es zeigte sich, daß die Sauerstoffaufnahme nahezu 100% betrug mit einem  $P_{50}$ -Wert von 100 bis 120 mm Hg Sauerstoffdruck bei Atmosphärendruck und 37°C mit einer Lösung mit einem pH-Wert von 6,9 und einer Sauerstoffdissoziationskurve wie in Fig. 8 angegeben.

#### Beispiel 5

##### Umsetzung von Oxyhämoglobin mit Divinylsulfon

Die Umsetzung von Oxyhämoglobin mit Divinylsulfon wurde entsprechend Beispiel 4 durchgeführt mit der Ausnahme, daß alle Lösungen und die die Reaktion umgebende Atmosphäre Luft enthielten durch Äquilibrieren entweder mit Luft oder mit 100%igem O<sub>2</sub>. Die bis zur vollständigen Reaktion erforderliche Zeit, wie sie durch Elution durch Bio-Gel® P-150 bestimmt wurde, betrug ungefähr 96 Stunden.

Die Umwandlung zu makromolekularem Hämoglobin wurde bestimmt durch Gelfiltration und die kovalente Vernetzung wurde nachgewiesen durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit Hilfe von Dodecylsulfat, entsprechend Beispiel 2. Es wurden ähnliche Ergebnisse für mit Divinylsulfon vernetztes Oxyhämoglobin erhalten wie für mit Glutaraldehyd oder Divinylsulfon vernetztes Deoxyhämoglobin wie in den Beispielen 2 und 4 beschrieben. Die Spektralanalyse der oxidierten Lösung im ultravioletten und sichtbaren Bereich zeigt das in Fig. 9 angegebene Absorptionsspektrum. Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe der Geldurchdringungschromatographie und Viskositätsmethoden sind in Tabelle 1 angegeben. In Tabelle 2 sind die Extinktionskoeffizienten für Polyhämoglobin in Form von Methämoglobin und Cyanomethämoglobin angegeben.

Die Lösung von vernetztem Oxyhämoglobin in einem physiologischen Träger war iso-osmotisch, 300 mOsm/kg H<sub>2</sub>O ( $\pm 10\%$ ) mit einer Intrinsic-Viskosität  $[\eta] = 0,061$  dl/g. Die relative Viskosität war im wesentlichen von der Konzentration unabhängig, wie aus der die Rauten verbindenden Kurve in Fig. 4 hervorgeht. Die Untersuchung des makromolekularen Oxyhämoglobins auf Gesamthämoglobin und Methämoglobin ergab eine Hämoglobinkonzentration von ungefähr 8,5% (Gew./Vol.) und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,4% (Gew./Vol.). Es zeigte sich, daß das Sauerstoffaufnahmevermögen nahezu 100% betrug und der  $P_{50}$ -Wert 4 mm Hg Sauerstoffdruck bei Atmosphärendruck und 37°C mit einer Lösung mit einem pH-Wert von 6,9 und einer Sauerstoffdissoziationskurve wie in Fig. 10 angegeben ist.

## Beispiel 6

## Umsetzung von Deoxyhämoglobin mit Hexamethylen-diisocyanat

5 In einen mit Argon äquilibrierten 100-ml-Rundkolben wurden bei 4°C unter Luftausschluß 20 ml Deoxyhämoglobinlösung, 12% (Gew./Vol.) in 0,05 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,1 gegeben und die Lösung durch kontinuierliches Spülen mit feuchtem Argon luftfrei gehalten. Die Lösung wurde ungefähr 18 Stunden zur Entfernung möglicher Luftverunreinigungen unter Rühren unter Stickstoff bei dieser Temperatur gehalten.

10 Anschließend wurden 0,138 ml Hexamethylen-diisocyanat zu dem Deoxyhämoglobin zugegeben und die Reaktionsteilnehmer unter den oben beschriebenen Bedingungen 72 Stunden gerührt, um das Deoxyhämoglobin zu vernetzen. Etwaiges überschüssiges in dem Reaktionsgemisch verbliebenes Hexamethylen-diisocyanat wurde durch Zugabe von 4 ml luftfreier 1,3 m Lysinlösung deaktiviert und anschließend 18 Stunden gerührt, um sicherzustellen, daß die Deaktivierung vollständig war. Die Lösung wurde oxidiert und durch Zentrifugieren geklärt.

15 Die Umwandlung zu polymerisiertem Hämoglobin wurde bestimmt durch Gelfiltration durch Biogel® P-150. Der Hauptteil des eluierten Produktes, 85%, drang nicht in die Gelporen ein, was ein Proteinmolekulargewicht von mehr als 150 000 Dalton anzeigt. Die Untersuchung des polymerisierten Deoxyhämoglobins auf Gesamthämoglobin und Methämoglobin ergab eine Hämoglobinkonzentration von ungefähr 9,5% (Gew./Vol.) und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,7% (Gew./Vol.). Es zeigte sich, daß der P<sub>50</sub>-Wert des polymerisierten Hämoglobins 3,5 mm Hg Sauerstoffdruck bei Atmosphärendruck und 37°C mit einer Lösung mit einem pH-Wert von 7,1 war.

## Beispiel 7

## 25 Umsetzung von Oxyhämoglobin mit Hexamethylen-diisocyanat

Die Umsetzung von Oxyhämoglobin mit Hexamethylen-diisocyanat wurde entsprechend dem in Beispiel 6 angegebenen Verfahren durchgeführt, wobei die gleichen Bedingungen angewandt wurden, mit der Ausnahme, daß die Lösung und die die Reaktion umgebende Atmosphäre durch Äquilibrieren mit Luft oder Sauerstoff Luft  
30 enthielten. Die prozentuale Umwandlung zu polymerisiertem Oxyhämoglobin, wie sie durch Gelfiltration bestimmt wurde, ergab Werte, die mit den in Beispiel 6 erhaltenen übereinstimmten für eine Ausbeute von 85% makromolekularem Oxyhämoglobin.

## Beispiel 8

## 35 Umsetzung von Deoxyhämoglobin mit Dimethylsuberimidatdihydrochlorid

Die Vernetzung von Deoxyhämoglobin wurde folgendermaßen durchgeführt: In einen 50-cm<sup>3</sup>-Dreihals-Rundkolben, der mit Argon gespült und auf 5 bis 10°C gehalten worden war, wurden zunächst 20 ml Deoxyhämoglobin in einer Konzentration von 13% (Gew./Vol.) in 0,25 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 8,0 und  
40 einem Methämoglobingehalt von weniger als 0,3% (Gew./Vol.) gegeben und anschließend 263 mg Dimethylsuberimidatdihydrochlorid in 4 ml von Luft befreiter gesättigter Natriumbicarbonatlösung. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wurde mit 1n NaOH auf 8 eingestellt und durch Zugabe von 1m NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf diesem Wert gehalten, bis er sich ungefähr 15 Minuten lang nicht mehr änderte. Der Kolben wurde mit Stopfen verschlossen, und die Reaktion konnte eine Stunde bei 4°C unter Rühren ablaufen. Der Kolben wurde geöffnet und mit Luft  
45 äquilibriert. Die Reaktion wurde abgebrochen durch Zugabe von 2 ml 1,3 m Lysin, wobei das Gemisch weitere 3 Stunden gerührt wurde, um den Reaktionsabbruch sicherzustellen. Schließlich wurde die Lösung durch Zentrifugieren geklärt und anschließend gegen 0,05 m Phosphatpuffer, pH 7,6, dialysiert.

Die Umwandlung zu polymerisiertem Hämoglobin wurde durch Gelfiltration durch Biogel® P-150 bestimmt. Der Hauptteil des eluierten Produktes (90%) blieb außerhalb der Gelporen, was ein Molekulargewicht von über  
50 150 000 Dalton anzeigt. Das makromolekulare Deoxyhämoglobin besaß auch eine Hämoglobinkonzentration von ungefähr 8% und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,6% (Gew./Vol.). Es zeigt sich, daß der P<sub>50</sub>-Wert des polymerisierten Hämoglobins 2,5 mm Hg Sauerstoffdruck bei Atmosphärendruck und 20°C mit einer Lösung mit einem pH-Wert von 7,35 betrug.

55

## Beispiel 9

## Umsetzung von Oxyhämoglobin mit Dimethylsuberimidatdihydrochlorid

60 Die Vernetzung von Oxyhämoglobin mit Dimethylsuberimidat wurde entsprechend dem Verfahren des Beispiels 8 durchgeführt, wobei die gleichen Bedingungen angewandt wurden, mit der Ausnahme, daß die Lösung und die Reaktionsatmosphäre durch Äquilibrieren mit Luft lufthaltig waren. Die physikalische Analyse des polymerisierten Oxyhämoglobins zeigte Ergebnisse, die mit dem vernetzten Deoxyhämoglobin des Beispiels 8 übereinstimmten. Der P<sub>50</sub>-Wert betrug 2,5 mm Hg Sauerstoffdruck bei Atmosphärendruck und 37°C mit einer  
65 Lösung mit einem pH-Wert von 7,45.

Beispiel 10

Polymerisation von Oxyhämoglobin mit Butadiendiepoxid

20 ml Oxyhämoglobinlösung, 13,4% (Gew./Vol.), in 0,05 m Boratpuffer mit einem pH-Wert von 8,0 und einem Methämoglobingehalt von weniger als 0,5% (Gew./Vol.) wurden in einen Kolben, enthaltend 320 µl Butadiendiepoxid und 370 µl Triäthylamin, beide in Form von reinen (neat) Lösungen, gegeben. Die Lösung wurde 96 Stunden unter Luft bei 5°C gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 500 mg festem Cystein abgebrochen. Der Feststoff wurde durch Rühren gelöst und 18 Stunden zur Reaktion gebracht. Die Analyse der intermolekularen Vernetzung wurde durch Gelfiltration durch Biogel®-P-150 durchgeführt. Der Hauptteil des eluierten Produktes, 85%, blieb außerhalb des Gels, was ein Molekulargewicht von mehr als 150 000 Dalton angibt. Die Analyse des polymerisierten Oxyhämoglobins auf Gesamthämoglobin und Methämoglobin ergab eine Hämoglobinkonzentration von ungefähr 9,5% und eine Methämoglobinkonzentration von weniger als 0,4% (Gew./Vol.).

Tabelle 1

Molekulargewicht von polymerisiertem Hämoglobin

polymerisiertes Hb	Verfahren*)	M <sub>w</sub> (× 10 <sup>-5</sup> )	M <sub>N</sub> (× 10 <sup>-5</sup> )	D.P.	M̄ <sub>visk.</sub> (× 10 <sup>-5</sup> )
Beispiel 2	1	5,3(± 0,8)	0,9(± 0,1)	5,6(± 0,6)	—
	2	—	—	—	1,6
Beispiel 3	1	11,2(± 1,1)	1,6(± 0,3)	9,6(± 1,8)	—
	2	—	—	—	1,8
Beispiel 4	1	5,9(± 1,8)	1,1(± 0,1)	6,8(± 0,6)	—
	2	—	—	—	2,3
Beispiel 5	1	5,0(± 1,4)	0,95(± 0,1)	6,0(± 0,6)	—
	2	—	—	—	1,0

\*) Angewandtes Verfahren  
(1) GPC-Sepharose®4B  
(2) Viskosität

Tabelle 2

Spektrale Eigenschaften von Hämoglobin und polymerisiertem Hämoglobin

Beispiel	Hb oder Poly(Hb) <sub>n</sub>	Form	λ	ε × 10 <sup>-3</sup>
1	Hb	M	630	3,7
1	Hb	C	540	11,1
2	Poly(Hb) <sub>n</sub>	M	630	3,9
2	Poly(Hb) <sub>n</sub>	C	540	9,7
4	Poly	C	540	9,4
5	Poly	M	630	3,2
5	Poly	C	540	9,7

Dabei bedeutet Poly(Hb)<sub>n</sub> polymerisiertes Hämoglobin, M Methämoglobin, C Cyanomethämoglobin, λ die Wellenlänge und ε den molaren Extinktionskoeffizienten.

Die erfindungsgemäßen vernetzten stromafreien Hämoglobine besitzen die Fähigkeit, sich mit einem Liganden wie Sauerstoff oder Kohlenmonoxid abzusättigen und diesen Liganden zu transportieren und an die Umgebung, wo er gebraucht wird, oder einen Ligandenrezeptor abzugeben. Diese Eigenschaft macht die Polyhämoglobine geeignet als Blutersatzstoffe. Das Polyhämoglobin ist löslich in wäßrigen Medien, Blut, Plasma, Kristalloidlösungen, gepufferten Elektrolytlösungen und kolloidalen Polymerlösungen. Das Polyhämoglobin besitzt physiologisch geeignete kolloid-osmotische Eigenschaften, die es als Blutplasma-Streckmittel machen. Polyhämoglobin besitzt eine verlängerte Plasma-Lebensdauer in vivo, wie aus einer Halbwertszeit von mehr als dem doppelten von nicht polymerisiertem Hämoglobin hervorgeht. Üblicherweise etwa 12 bis 30 Stunden. Außerdem werden, da das Polyhämoglobin stromafrei ist, schädliche Wirkungen auf das Nierensystem vermieden.

Die Fähigkeit des Polyhämoglobins, Sauerstoff an lebendes Gewebe und Organe von Tieren einschließlich Haustieren wie Hunden und Katzen und Kühen und Schweinen und anderen Säugetieren zu transportieren und zu liefern und verschiedene Liganden auszutauschen, wird durch die unten angegebenen Beispiele gezeigt. Der Ausdruck "im wesentlichen stromafrei", wie er in diesen Beispielen und der übrigen Beschreibung verwendet



wird, bedeutet, daß das Polyhämoglobin kein Stromamaterial von roten Blutzellen einschließlich nicht-Hämoglobinproteine, Phospholipide und Lipide enthält. "Halbwertszeit" bedeutet die Zeit, in der eine ursprüngliche Polyhämoglobinmenge in vivo auf die Hälfte ihres anfänglichen Wertes absinkt. "Dissoziationskurven" gibt das Ausmaß an, in dem Polyhämoglobin den Liganden, z. B. Sauerstoff, unter einer Ligandenspannung von 0 bis 140 mm Hg bindet bzw. enthält. "Sauerstoffbindungsvermögen" bedeutet den Teil in Prozent der Sauerstoffmenge, der sich mit jeder in Polyhämoglobin enthaltenen Hämgruppe verbinden kann. Zum Beispiel bedeutet eine Sauerstoffaufnahmefähigkeit von 100%, daß jede in dem Polyhämoglobin enthaltene Hämgruppe das Maximum von einem Sauerstoffmolekül binden kann. "Sauerstoffaffinität" bedeutet den  $P_{50}$ -Wert von Polyhämoglobin, d. h. den Teildruck  $PO_2$  von Sauerstoff bei 50%iger Sättigung. "Blutersatzstoff" bedeutet die Fähigkeit des Materials, Sauerstoff an lebendes Gewebe und Organe zu transportieren und zu liefern und den intravaskulären (oncotic)-Druck aufrechtzuerhalten. "Plasma-Streckmittel" bedeutet die Fähigkeit von Polyhämoglobinlösungen, das Blutvolumen aufzufüllen.

#### Beispiel 11

Die Verweilzeit von Polyhämoglobin im Plasma wurde folgendermaßen gemessen: Zunächst wurde am Tag vor der Infusion ein Dauerkatheter in die vena saphena im Hinterbein von zwei Hunden eingeführt und das Blutvolumen der Hunde nach Standardverfahren berechnet. Das berechnete Blutvolumen wurde auf das Gewicht des Hundes bezogen, mit der Annahme, daß das Blutvolumen bei Hunden ungefähr 7% des Gesamtkörpergewichts ausmacht. Dann wurden am nächsten Tag 20% des Blutvolumens durch den Katheter abgezogen und sofort durch das gleiche Volumen Polyhämoglobin in einer Konzentration von 7% in Ringer's Lösung ersetzt. Bei einem anderen Hund wurden 20% des Blutvolumens durch das gleiche Volumen von ursprünglichem menschlichem Hämoglobin ersetzt. Ursprüngliches Hämoglobin ist isoliertes, nicht vernetztes Hämoglobin mit einer Konzentration von 7% in Ringer's Lösung. Dann wurden von beiden Hunden in Intervallen von zwei Stunden Blutproben entnommen, bis das Hämoglobin in dem Plasma abfiel wie durch Spektrophotometrie nach dem Cyanomethämoglobinverfahren, das in Beispiel 1 beschrieben ist, bestimmt wurde. Die Halbwertszeit von Polyhämoglobin und ursprünglichem (nativem) Hämoglobin wurde durch eine halb-logarithmische Auftragung der Zeit gegen die Hämoglobinkonzentration in dem Plasma bestimmt, da dadurch eine etwaige exponentielle Abnahme auf eine lineare Abnahme zurückgeführt wird. Die gemessenen Ergebnisse zeigten, daß die nach den Beispielen 2 bis 5 hergestellten Polyhämoglobine eine 2- bis 8fache Zunahme der Verweilzeit im Plasma ergaben, bezogen auf ursprüngliches Hämoglobin, das eine Halbwertszeit von 4 Stunden in dem Plasma eines Hundes hatte.

#### Beispiel 12

Die erhöhte Verweilzeit von Deoxyhämoglobin, das entsprechend Beispiel 2 mit Glutaraldehyd vernetzt war, und Hämoglobin wurde an männlichen Ratten gemessen, die 250 bis 300 g wogen und bei denen sich in einer Femor-Vene eine Kanüle zur Infusion befand und in einer Femor-Arterie eine Kanüle zur Entnahme von Proben, entsprechend dem Beispiel 11. Außerdem wurde das Blutvolumen der Ratte mit 8% des Gesamtkörpergewichts berechnet, und das Polyhämoglobin besaß eine Konzentration von 8% in normaler Salzlösung. Die Blutproben, 0,3 ml wurden mit 500 g zentrifugiert, um die Zellen abzusetzen. Das Plasma, enthaltend Polyhämoglobin, wurde nach der Cyanohämoglobin-Spektralmethode des Beispiels 1 auf die Polyhämoglobinkonzentration untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß Hämoglobin eine Halbwertszeit in dem Plasma von 90 Minuten besaß, während das Polyhämoglobin eine längere Halbwerts-Verweilzeit im Rattenplasma von 315 Minuten besaß.

#### Beispiel 13

Ein Blutaustausch (total perfusion) bei Ratten mit Polyhämoglobin wurde folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurden übliche männliche weiße Laborratten mit einem Gewicht von 250 bis 300 g mit 40 mg/kg Natriumpentobarbital anaesthetisiert. Dann wurden in beide Femor-Arterien und eine Femor-Vene Kanülen eingeführt und den Ratten Heparin zugeführt. Während der gesamten Untersuchung wurde der Druck der Hauptarterie der Ratten kontinuierlich über eine Femor-Arterie notiert und durch die andere Arterie das Blut abgezogen. Die Femor-Vene wurde für die Infusion von Polyhämoglobin angewandt. Der Anfangsanteil an Erythrozyten (Hämokrit) wurde bestimmt und 2 ml Blut abgezogen. Anschließend wurden 2 ml polymerisiertes Hämoglobin, das entsprechend Beispiel 2 hergestellt worden war, innerhalb von 2 bis 3 Minuten durch Infusion zugeführt. Dann in Intervallen von ungefähr 5 Minuten jeweils 1 ml Blut abgezogen und 1 ml Polyhämoglobin durch Infusion den Ratten zugeführt und der Blutaustausch fortgesetzt, bis das gesamte Blutvolumen, das als 8% des Körpergewichtes angenommen wurde, abgezogen worden war. Wenn die Tiere Anzeichen einer Schockreaktion zeigten, wie durch eine falsche Atmung oder einen abnehmenden arteriellen Druck angezeigt wurde, wurde die Zeit zwischen deren einzelnen Entnahmen verlängert, aber die Polyhämoglobinfusionsgeschwindigkeit von 1 ml alle 5 Minuten beibehalten, um die Tiere am Leben zu erhalten. Alle 15 bis 20 Minuten wurde ein Hämokrit bestimmt und die Blutentnahme und Infusion fortgesetzt, bis der Hämokrit von 45 auf weniger als 5% gefallen war. Während der gesamten Versuche erschien die Haut der Ratten normal, und es schien kein Polyhämoglobin in die extrazellulären Flüssigkeiten auszutreten, wie es der Fall war, wenn das Blutvolumen ersetzt wurde durch eine nicht-polymerisierte Hämoglobininlösung in Glukose-Salzlösung. Die Ergebnisse zeigten, daß das Polyhämoglobin Sauerstoff an das Gewebe lieferte, ohne in die extrazellulären Flüssigkeiten zu diffundieren.

## Beispiel 14

Die Fähigkeit von Polyhämoglobin, Sauerstoff an tierisches Gewebe zu liefern, wurde an einem isolierten mit Blut durchströmten Kaninchenherzseptum folgendermaßen nachgewiesen: Zunächst wurde das Herz eines anaesthetisierten und heparinisierten Kaninchens entfernt und eine Septum-Arterie mit einer Kanüle versehen und der äußere Muskel entfernt. Die Durchströmung mit Hunderythrozyten in einer Lösung von Glukose in physiologischer Salzlösung wurde begonnen, sobald das Herz aus dem Körper entfernt worden war, um eine mögliche Schädigung des Gewebes zu vermeiden. Dann wurde das Septum in den Rahmen gespannt, so daß der Herzschlag und die Änderungsgeschwindigkeit der Spannung gemessen werden konnten. Der Sauerstoffverbrauch des Septums wurde variiert durch Änderung der Herzgeschwindigkeit, Durchströmungsgeschwindigkeit und Temperatur des Septums. Die Versuchsbedingungen, die zu einem maximalen Sauerstoffverbrauch des Septums führten, ohne daß der damit verbundene Verlust der Septumstabilität auftrat, wurden mit Hilfe von Hunderythrozyten als Durchströmungsflüssigkeit bestimmt. Der arterielle und venöse Sauerstoffgehalt wurde mit Hilfe eines Standard-Sauerstoffmeßinstrumentes gemessen, und die Änderung in der Hämoglobinsättigung von dem arteriellen zu dem venösen Blutstrom wurde mit Hilfe der in Beispiel 2 beschriebenen Vorrichtung zur Messung der Sauerstoffsättigung bestimmt.

Die Ergebnisse der Durchströmungsmessungen mit dem in den Beispielen 2 bis 5 angegebenen Polyhämoglobin zeigten, daß die Sauerstoffsättigung 50 bis 70% und der Sauerstoffgehalt 3 Vol.-% zwischen der arteriellen und venösen Seite des Septums abnahm, was anzeigt, daß Polyhämoglobin in dem durchströmten in-vivo-System Sauerstoff an lebendes Gewebe liefert. Ein allgemeines Verfahren für die Perfusion in isolierten Septa ist beschrieben in J. General Physiology, Band 52, Seiten 682 bis 691, 1968.

## Beispiel 15

Die Verwendung von Polyhämoglobin zur Behandlung des hämorrhagischen Schocks wurde folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurde einem Tier Blut entnommen bis zu einem geringen Standard-Blutdruck und der Blutverlust durch ein gleiches Volumen des zu untersuchenden Blutersatzstoffes ersetzt. Später wurde dem Tier erneut Blut entnommen und das Verhältnis der zweiten zu der ersten Entnahme als Blutungsindex  $Bl_2 : Bl_1 \times 100$  angegeben. Bei diesen Verfahren wurde männlichen Ratten Blut bis zu einem niedrigen Standarddruck von 30 mm Hg entnommen und dieser Zustand 45 Minuten durch Entnahme von Blut zur Aufrechterhaltung des Druckes beibehalten. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Volumen des entnommenen Blutes notiert und ergab den Wert  $Bl_1$  und durch Blut, Salzlösung, Dextran, Albumin, ursprüngliches Hämoglobin oder Polyhämoglobin ersetzt. Die Ratten konnten sich drei Stunden erholen, und dann wurde erneut Blut entnommen bis zu einem Wert von 30 mm Hg, wobei man, wie oben angegeben, den Wert für  $Bl_2$  erhielt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3 angegeben und sie zeigen, daß polymerisiertes Hämoglobin bei diesem Modell eines hämorrhagischen Schocks wie ganzes Blut wirkt. In der Tabelle sind die Blutersatzstoffe die nach den Beispielen 2 bis 5 hergestellten Hämoglobine und B bedeutet das eigene Blut der Ratten, S eine physiologische Kochsalzlösung, A Albumin, H ursprüngliches bzw. natives Hämoglobin und D Dextran. Die Verfahren zur Messung des Blutungsindex sind beschrieben in Am. J. Physiol. Band 169, Seite 475, 1952, und Am. J. Physiol. Band 173, Seite 403, 1953.

Tabelle 3

Ersatzstoffe	Blutungsindex	Anzahl der Tiere
Beispiel 2	100 ± 13	3
Beispiel 3	48 ± 15	4
Beispiel 4	72 ± 23	5
Beispiel 5	75 ± 16	3
B	81 ± 13	24
S	27 ± 12	25
A	71 ± 9	3
H	36 ± 6	2
D	30 ± 11	17

Das Polyhämoglobin kann angewandt werden als Blutplasma-Ersatzstoff und Blutplasma-Streckmittel im Gemisch mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger oder mit anderen Plasma-Ersatzstoffen und Blutplasma-Streckmitteln. Die Träger können kristalloide einschließlich physiologischer Kochsalzlösung, ein Gemisch, bestehend aus Salzlösung und Glukose, Ringer's-Lösung, mit Laktat versetzte Ringer's-Lösung, Locke-Ringer's-Lösung, Krebs-Ringer's-Lösung, Hartmann's-Salzlösung und heparinisierte Natriumcitrat-Citronensäure-Dextrose-Lösung sein.

Das Polyhämoglobin kann im Gemisch vorliegen mit wasserlöslichen physiologisch geeigneten polymeren Plasma-Ersatzstoffen wie Polyäthylenoxid, Polyacrylamid, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol und Äthylenoxid-Polypropylen glykol-Kondensaten. Außerdem kann das Polyhämoglobin vermischt sein mit kolloidartigen Plasma-Ersatzstoffen und Blutplasma-Streckmitteln wie linearen Polysacchariden einschließlich Dextranen mit einem Molekulargewicht von 40 000 bis 70 000, Gummiarabikum-Pektinen, (balanced) flüssiger Gelatine und Hydroxyäthylstärke. Im allgemeinen ist für die erfindungsgemäßen Zwecke das Polyhämoglobin in einem Mittel

in einer Menge von ungefähr 1 bis 10% im Gemisch mit einem oder mehreren der oben angegebenen Träger vorhanden. Die Mittel werden hergestellt durch Vermischen des Polyhämoglobins und Trägers in vorbestimmten Mengen. Zum Beispiel kann eine Blutersatzlösung, enthaltend 5% Polyhämoglobin in normaler Kochsalzlösung hergestellt werden durch Zugabe von 5 g Polyhämoglobin zu der physiologischen Salzlösung, die 0,85% Natriumchlorid in Wasser enthält, auf 100 ml. Die Polyhämoglobine können verabreicht werden, wie es bei Bluttransfusionen üblich ist.

Andere Anwendungsgebiete für Polyhämoglobine umfassen eine künstliche Sauerstoffaustauschlösung in üblichen Oxygenatoren wie Herznebenwegen (cardiac by-pass), außerhalb des Körpers gelegenen Kreislaufhilfen, hohlfaser- und folienartigen Membranen und zur Unterstützung des Kreislaufs bei kranken Patienten.

Das Polyhämoglobin kann angewandt werden als Quelle für Protein und Sauerstoff in der Mikrobiologie und als Nährstoff für aerobe Bazillen und Staphylokokken, wenn sichergestellt werden soll, daß der Nährstoff für die tierische und menschliche Ernährung sicher ist. Das Polyhämoglobin kann angewandt werden zur Lagerung und Konservierung von lebenden isolierten blutdurchströmten Säugetierorganen für eine eventuelle Transplantation in einen Empfänger als Ersatz für die Fähigkeit der roten Zellen bei Säugetieren, Sauerstoff zu transportieren.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines wasserlöslichen, polymerisierten, vernetzten Hämoglobins, das imstande ist, reversibel einen Liganden zu binden, und das frei ist von Stroma, wobei das Hämoglobin, das entweder Liganden enthält oder nicht, mit einem polyfunktionellen Vernetzungsmittel umgesetzt wird, das mit den reaktionsfähigen Gruppen des Hämoglobins unter Bedingungen reagiert, bei denen ein wasserlösliches, vernetztes Polyhämoglobin entsteht, dadurch gekennzeichnet, daß man Stroma und Zelltrümmer von dem Hämoglobin entfernt, indem man eine Suspension von roten Zellen lysiert, mit kaltem Toluol durch Schütteln extrahiert, stehen läßt, nach Bildung eines dreiphasigen Gemisches die untere klare rote Schicht gewinnt, diese zentrifugiert und die obere klare Flüssigkeit durch ein Diatomeenerdefilter filtriert, das Hämoglobin unter einer Schutzgasatmosphäre vernetzt und die Reaktion durch Zugabe eines Vernetzungsmittel-Desaktivators zu dem Reaktionsgemisch abbricht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Äquivalent Hämoglobin mit 2,5 bis 3000 Äq des Vernetzungsmittels 0,25 bis 300 h bei 0 bis 25°C unter Atmosphärendruck umsetzt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reaktion bei 0 bis 10°C durchführt.

4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als Desaktivator ein niedermolekulares primäres Amin verwendet.

5. Verwendung des Hämoglobins, erhalten nach Anspruch 1 bis 4, zusammen mit einem physiologisch geeigneten Träger, als Blutersatzstoff oder Blutplasma-Streckmittel.

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen



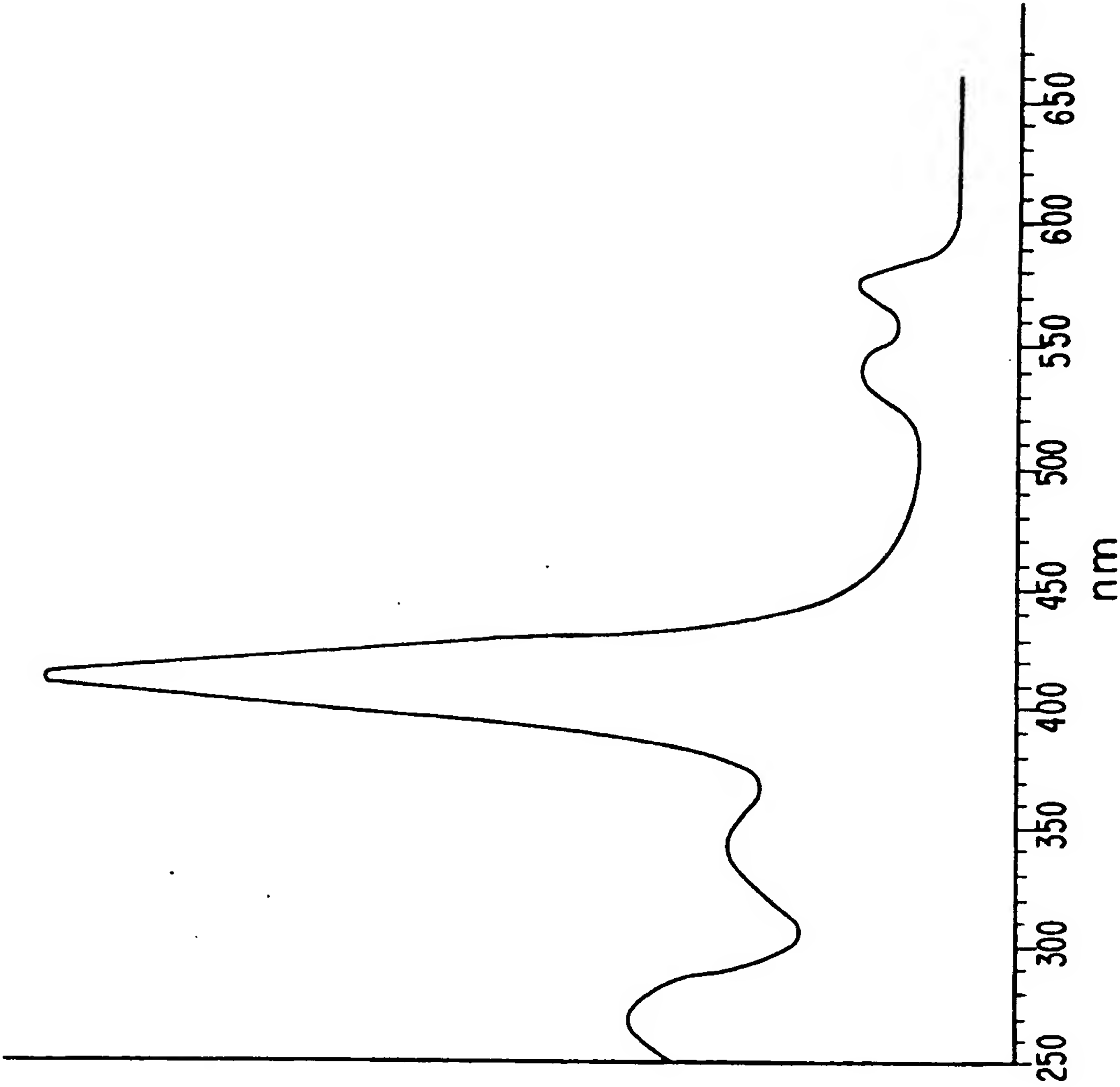


FIG. 1

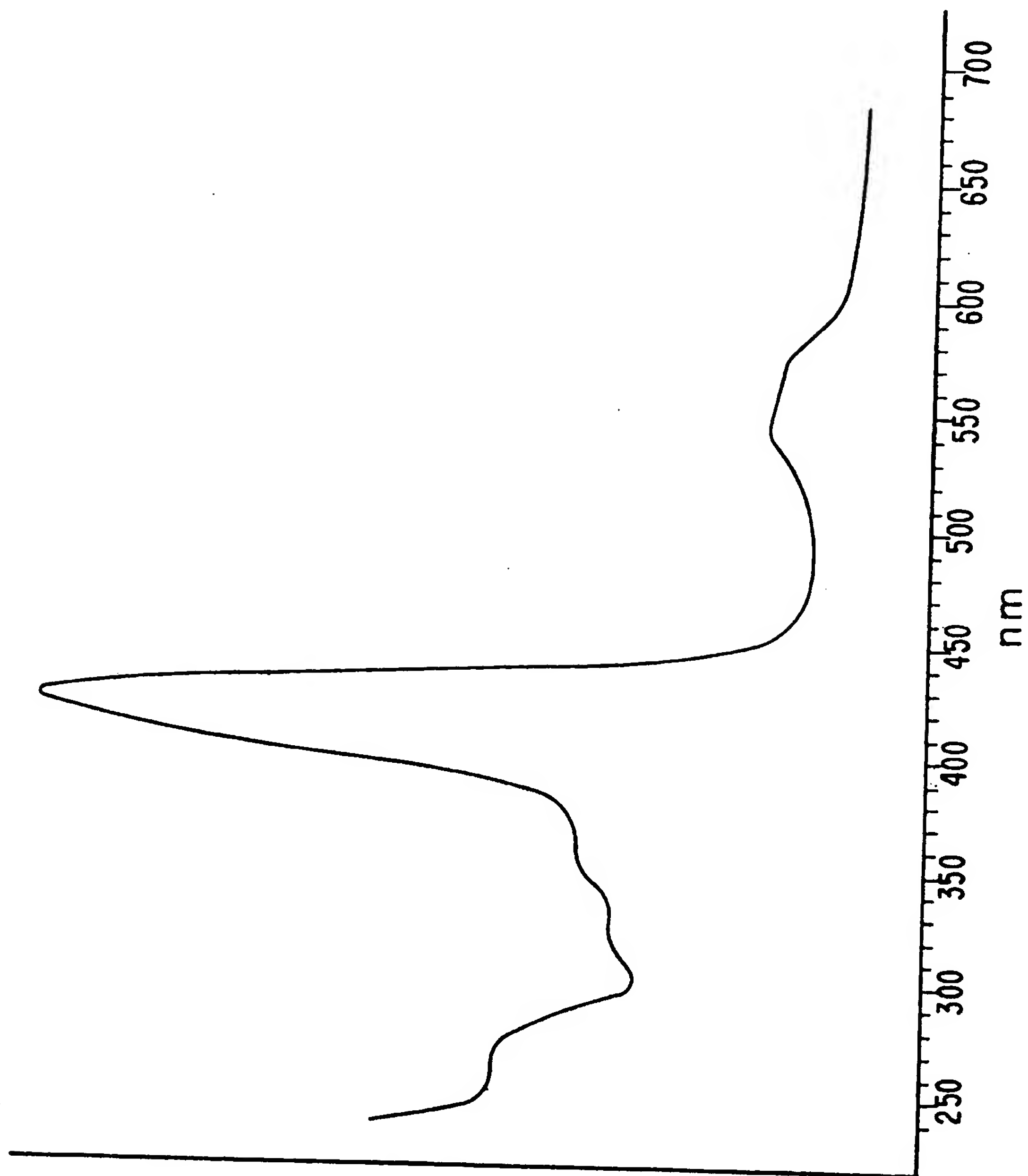
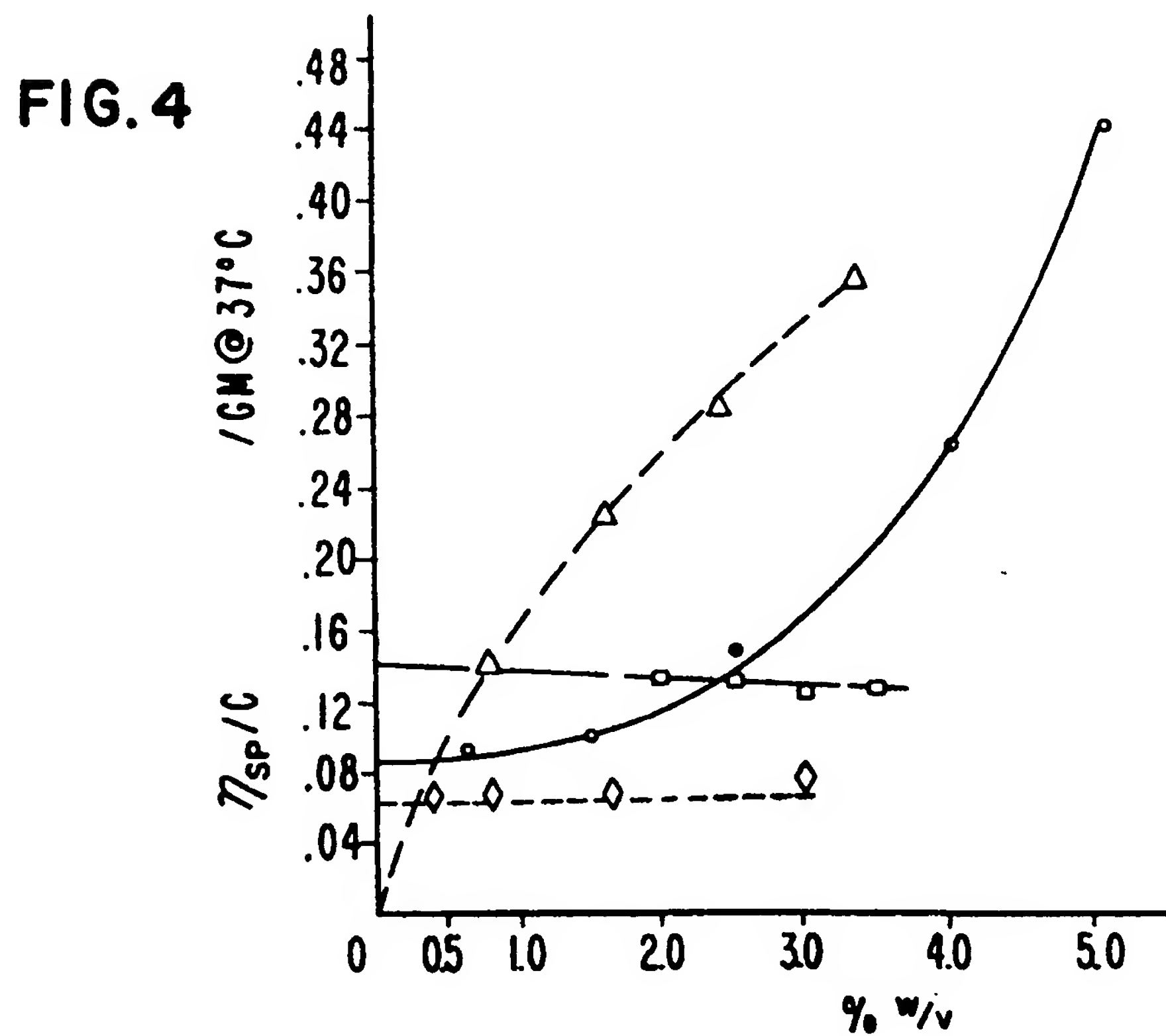
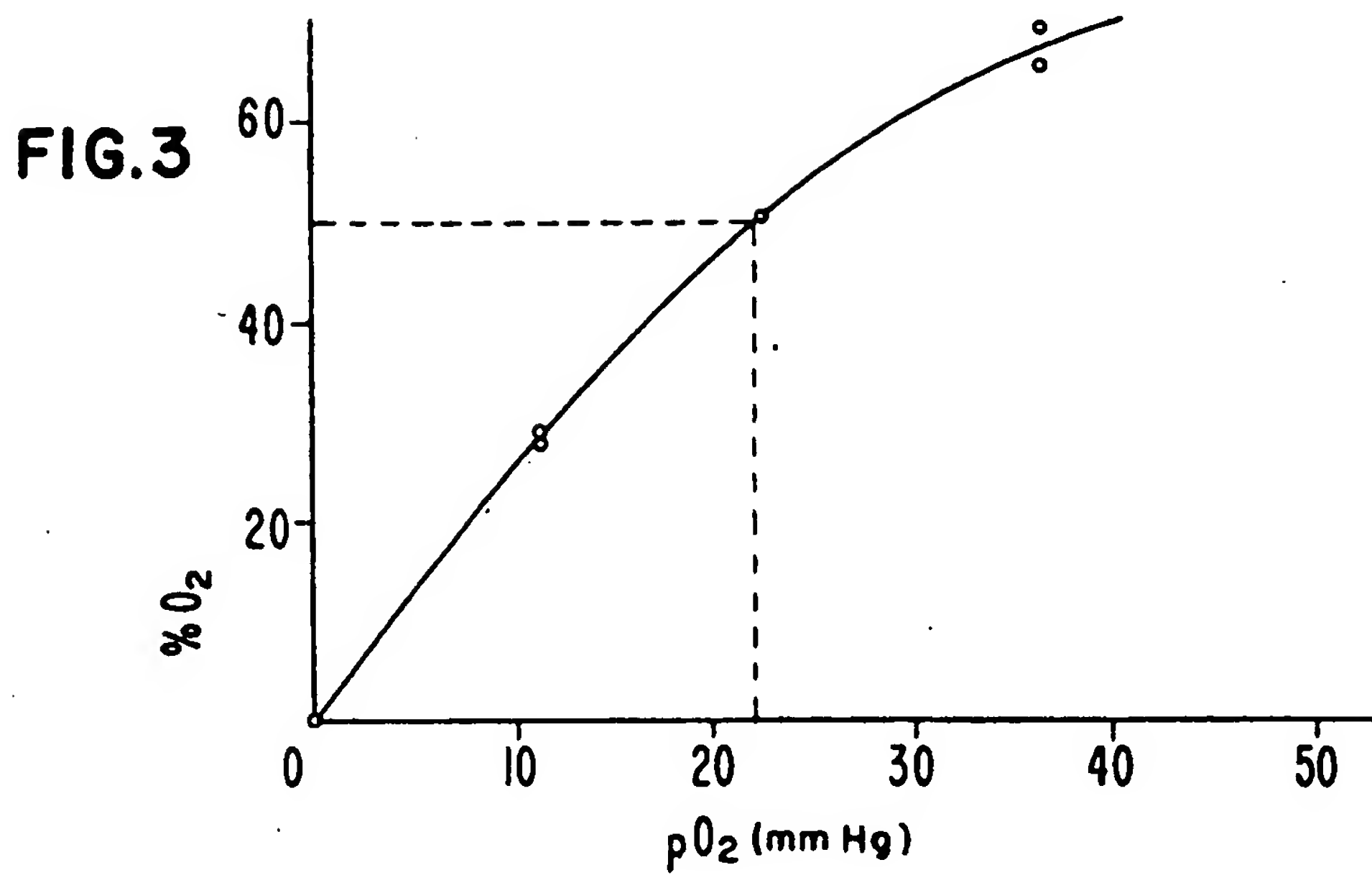
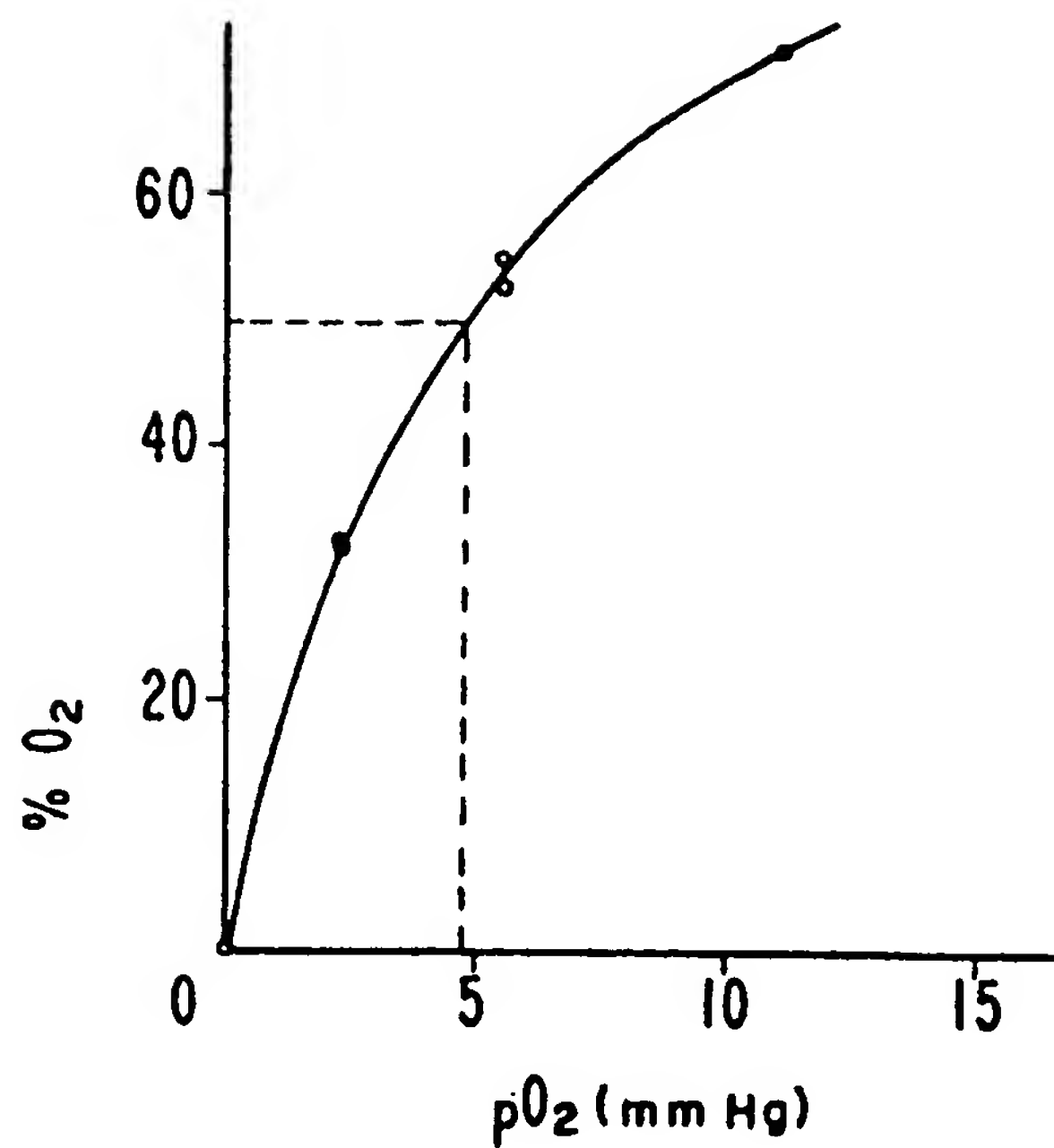


FIG. 2

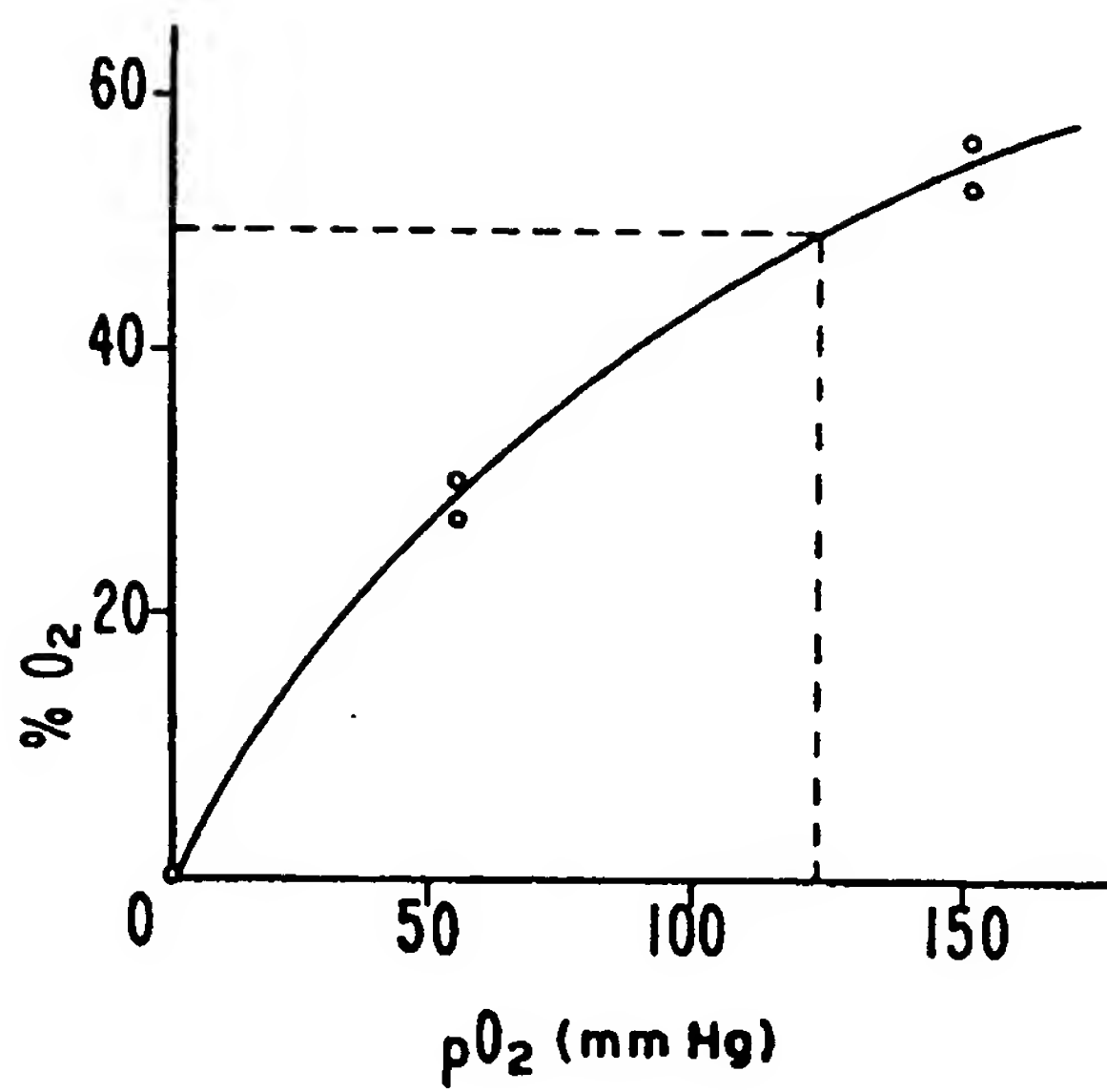




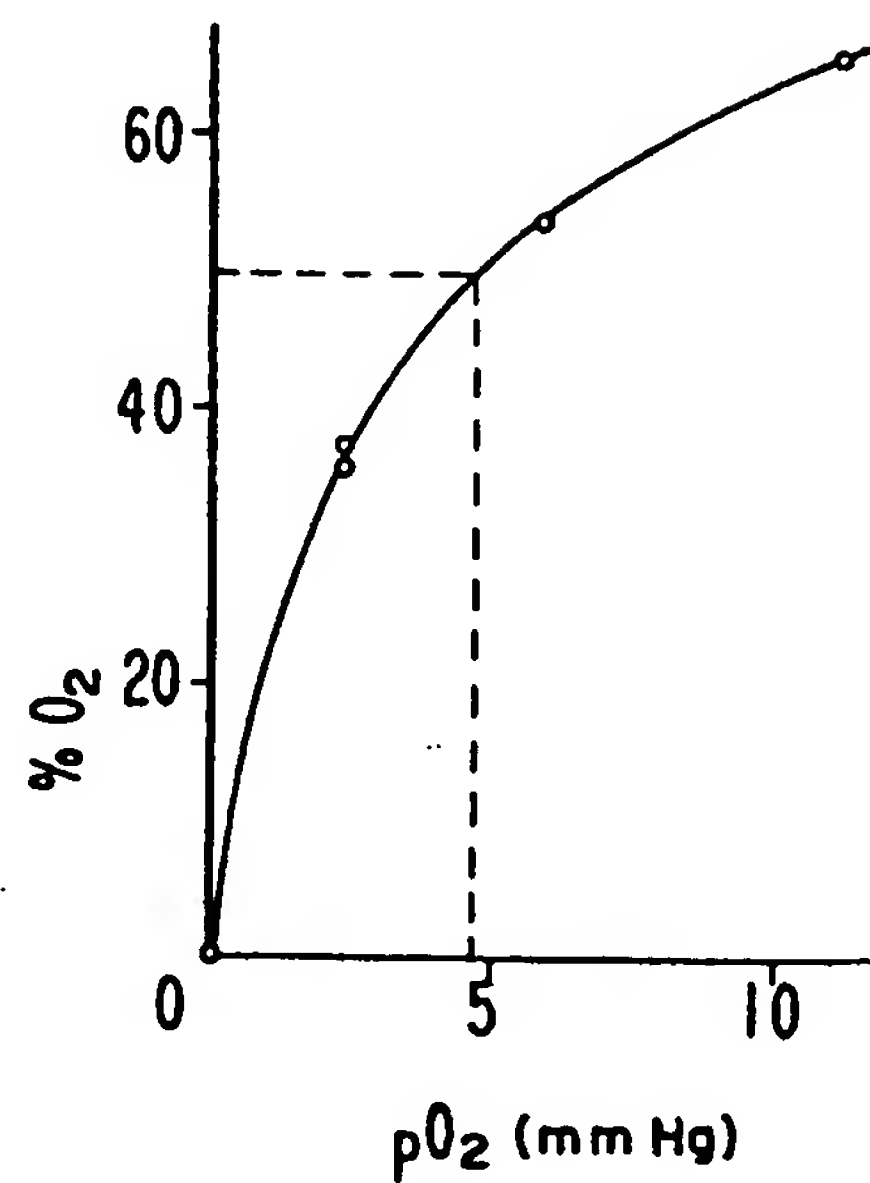
**FIG. 5**

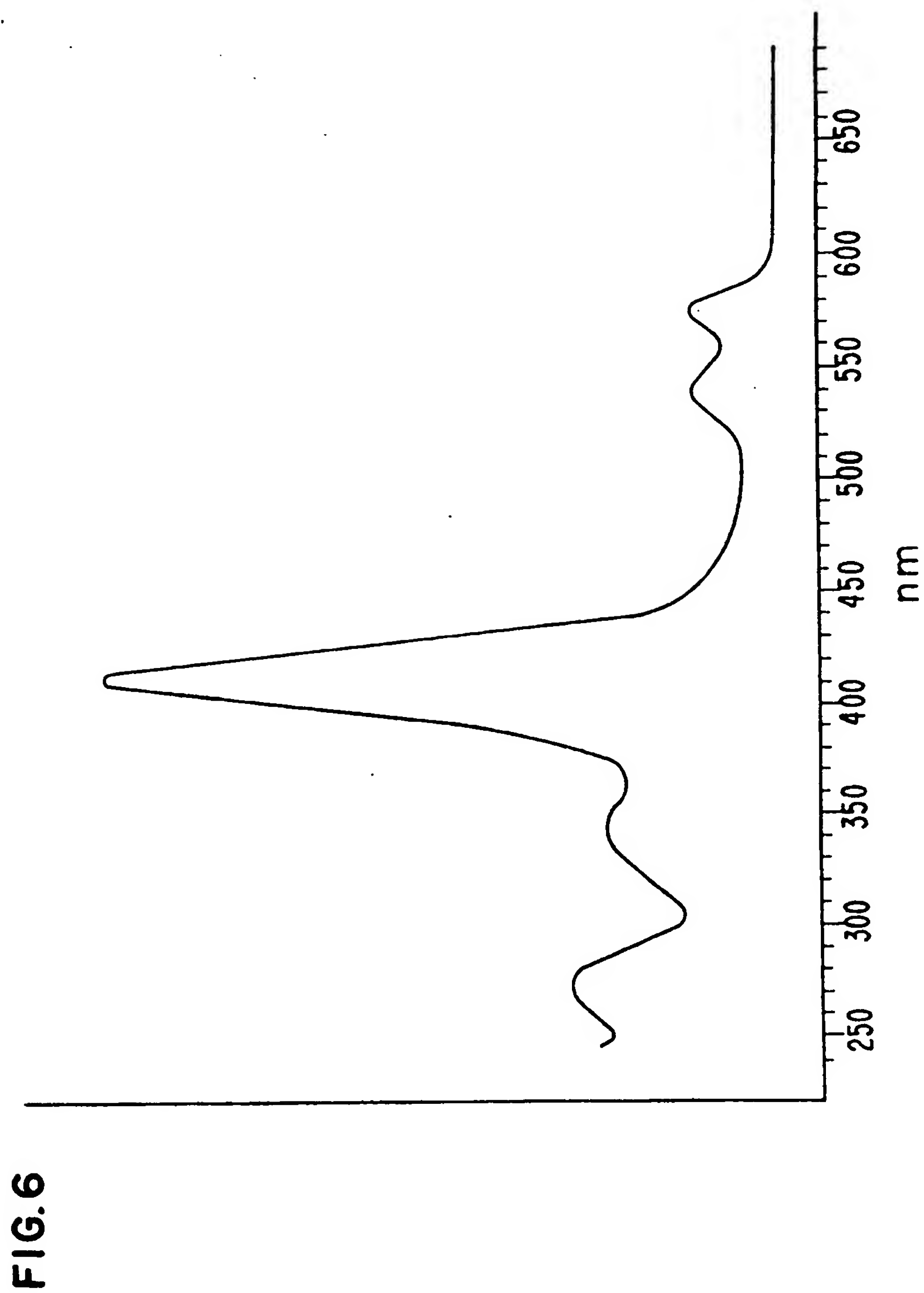


**FIG. 8**



**FIG. 10**





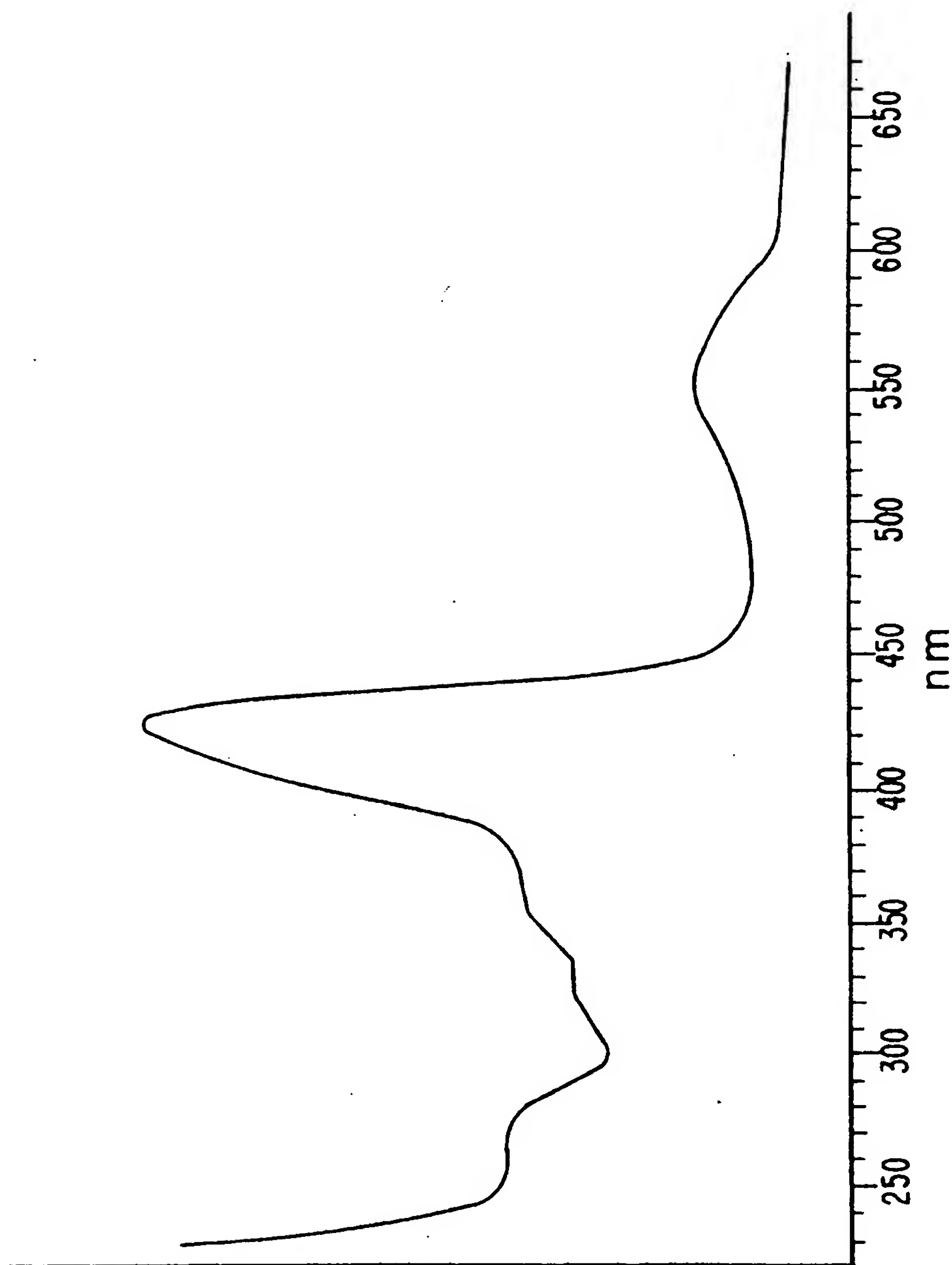


FIG. 7



